

Die Kohlenhydrate des Kollagens
und ihre Bedeutung
für die Quervernetzung

von

MANFRED K. KLENK

1960



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554020_0095

Die Kohlenhydrate des Kollagens
und ihre Bedeutung für die Quervernetzung

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
LUDWIG - MAXIMILIAN - UNIVERSITÄT
zu
München

vorgelegt
von
Manfred K.Klenk
aus
Nürnberg
im November 1960



Berichterstatter: Professor Dr. W. Graßmann
 Professor Dr. F. Lynen

Tag der mündlichen 30. November 1960
Prüfung:

Die vorliegende Arbeit wurde im Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München, in der Zeit von Juli 1958 bis Juli 1960 unter der Leitung von Herrn Prof.Dr.W.Graßmann ausgeführt.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof.Dr.W.Graßmann, der mir die Ausführung dieser Arbeit ermöglichte und der mir mit seiner reichen Erfahrung zur Seite stand, möchte ich an dieser Stelle für das erwiesene Wohlwollen meinen Dank aussprechen.

Herrn Dr.H.Hörmann, der mich jederzeit mit Rat und Tat unterstützte und der mir zahlreiche Anregungen zu dieser Arbeit gab, möchte ich ebenfalls auf das herzlichste danken.

Meiner lieben Frau
in Dankbarkeit
gewidmet

Inhaltsübersicht

	Seite
<u>A. Einleitung</u>	1
<u>B. Aufgabenstellung</u>	10
<u>C. Methodische Entwicklungen</u>	
I. Isolierung von Kohlenhydraten aus zuckerhaltigen Eiweißkörpern mittels Kationenaustauscherhydrolyse	12
II. Spektralphotometrische Untersuchungen von Kohlenhydraten	16
III. Die Bestimmung von Estergruppierungen mit Hydroxylamin	20
1.) Zur Messung des Fe-Hydroxamsäurekomplexes	21
2.) pH-Abhängigkeit der Umsetzung mit NH_2OH	23
3.) Ermittlung der Reaktionszeit	24
4.) Ausbeute an Hydroxamsäuren	25
5.) Spezifität der Hydroxamsäurebildung	27
<u>D. Ergebnisse dieser Dissertation</u>	
I. Stufenweiser Abbau von denaturiertem Kollagen mit Trypsin und Anreicherung der Kohlenhydrate	29
II. Kohlenhydrat-Stickstoffbilanz eines Trypsinabbau-gemisches von denaturiertem Kollagen	31
III. Identifizierung der Neutralzucker des Kollagens nach erfolgter Kationenaustauscherhydrolyse	35
IV. Der Perjodatabbau von Kollagen	40
1.) Einwirkung von Perjodat auf Kollagen ohne Wasserstoffbrückenbindungen sprengende Agentien	41
a) Geschwindigkeit der Reaktion	41
b) Verhalten der Zucker	42
c) Veränderung der Aminosäuren	42
d) Der Schrumpfungspunkt v. oxydiertem Kollagen	44
e) Löslichkeit des oxydierten Kollagens in Wasser bei erhöhten Temperaturen	45

	Seite
2.) Verhalten des oxydierten Kollagens gegen Wasserstoffbrückenbindungen spaltende Agentien	46
3.) Der Perjodatabbau von Kollagen bei erhöhter Temperatur	49
V. Der Hydroxylaminabbau von Prokollagen und Kollagen	50
1.) Verhalten von Prokollagen gegen Hydroxylamin	51
2.) Verhalten von Kollagen gegen Hydroxylamin ohne Wasserstoffbrückenbindungen spaltende Agentien Löslichkeit von hydroxylaminbehandeltem Kollagen in Wasser bei erhöhten Temperaturen	58
3.) Das Verhalten von Kollagen gegen Hydroxylamin in Gegenwart von Wasserstoffbrückenbindungen spalten= den Agentien	59
4.) Verhalten von Kollagen gegenüber verschiedenen Stickstoffbasen	65
VI. Untersuchungen der Perjodat- und Hydroxylaminabbaupro= dukte des Kollagens in Elektrophorese und Ultrazentrifuge	68
1.) Elektrophoretische Prüfung des Hydroxylaminabbau= produktes von Kollagen	68
2.) Untersuchung des Perjodatabbauproduktes von Kolla= gen in der Ultrazentrifuge	71
VII. Einwirkung von Trypsin auf das Hydroxylaminabbaupro= dukt des Kollagens	74
<u>E. Diskussion der Ergebnisse</u>	75
<u>F. Experimenteller Teil</u>	90
<u>G. Zusammenfassung</u>	100
<u>H. Literaturverzeichnis</u>	102
<u>Lebenslauf</u>	107

A. Einleitung.

Die tierische Haut ist ein komplexes Gebilde, das aus drei hauptsächlichen Schichten zusammengesetzt ist, die sich morphologisch weiter unterscheiden lassen. Die Oberhaut (Epidermis) bildet nach außen den Abschluß des Körpers, die eigentliche Lederhaut (corium) liegt in der Mitte und wird nach innen durch die Unterhaut (Hypodermis) begrenzt. Das Corium ist der am stärksten ausgebildete Hautabschnitt. Er ist verantwortlich für die Zähigkeit und Zerreißfestigkeit der Haut. Das Corium setzt sich aus innig miteinander verflochtenen und verfilzten Eiweißfasern (Kollagen) zusammen, die in eine gallertartige Grundsubstanz eingebettet sind. Kollagen und Interzellärs substanz werden von den Bindegewebszellen produziert. Uns interessiert in erster Linie das Kollagen, das den Hauptanteil des Coriums ausmacht, und ihm nahestehende Proteine.

Reifes Kollagen ist unlöslich. Es wird jedoch von einigen löslichen kollagenen Eiweißkörpern begleitet, die in der letzten Zeit erhöhtes Interesse der Forschung erregt haben, weil man durch sie Einblick in die Struktur und Biogenese der Kollagenfaser zu gewinnen hofft. Um 1900 gelang es Zacchariades (1), aus Rattenschwanzsehnen mit stark verdünnter Säure ein kollagenes Protein zu extrahieren. Etwa 30 Jahre später konnten Kageotte et al.(2) aus solchen Kollagenlösungen das Eiweiß in Form von "Kristallnadeln" wieder abscheiden. Diese Arbeiten wurden von Orechowitsch et al.(3) wieder aufgenommen und gezeigt, daß die wieder abgeschiedenen Kristallnadeln kurze Fasern mit einer dem Kollagen sehr ähnlichen elektronenmikroskopischen Feinstruktur sind. Weil dieses lösliche Kollagen besonders in jungen Tieren vorkommt, vermutete Orechowitsch, daß es sich um eine biologische Vorstufe des reifen Kollagens handelt und nannte es Prokollagen. Untersuchungen über den Stoffwechsel des Bindegewebes mit markiertem Glycin brachten weiteres Material, welches diese

Vorstellungen erhärtet (5). Auch die Aminosäurezusammensetzung des Prokollagens ist mit der des Kollagens identisch (4).

Es stellte sich weiter heraus, daß sich aus Bindegewebe nicht nur mit Säure Kollagene herauslösen lassen. Gross et al. (6) konnten mit verdünnten Kochsalzlösungen bzw. schwach alkalischen oder neutralen Phosphatpuffern aus kollagenem Material eine weitere Vorstufe des Kollagens, die sie vorerst als Tropokollagen bezeichneten, extrahieren. Diese Lösungen scheiden beim Stehen Fäserchen ab, die unter dem Elektronenmikroskop das normale Bild der Kollagenfibrillen mit der üblichen Periodenlänge von etwa 700 Å zeigen (6). Sie haben die Löslichkeit in Salzlösungen bei neutralem pH verloren, lösen sich aber im Gegensatz zu Kollagen vollständig in verdünnter Säure und entsprechen in dieser Hinsicht dem Prokollagen.

Heute neigen die meisten Autoren (18) zu der Ansicht, daß das nach Orechowitsch hergestellte Prokollagen (im englischen Sprachbereich als "Acid Soluble Collagen" bezeichnet) bereits den gebildeten aber noch nicht endgültig verfestigten Fibrillen des Kollagens angehört, das Tropokollagen dagegen eine noch gelöste nicht den Fibrillen entstammende Vorstufe ist (10). Nach Untersuchungen von Bensusan (84) beruhen die Unterschiede in der Löslichkeit von Prokollagen und Tropokollagen nur auf einem unterschiedlichen Ordnungszustand. Scheidet man gelöstes Kollagen in amorpher Form ab, so löst es sich auch in neutralen Salzlösungen, ist es dagegen bereits zur Faser kristallisiert, so kann es nur mehr in saurem Puffer in Lösung gebracht werden. Schmitt und Mitarbeiter (18) bezeichnen daher in ihren späteren Veröffentlichungen mit Tropokollagen das Monomere des gelösten Kollagens. Lösungen dieses Eiweißkörpers enthalten langgestreckte Partikeln von etwa 2800 Å Länge, 14 Å Durchmesser und einem Mol-Gewicht von etwa 300 000. Neben den normalen Kollagenfibrillen mit einer Periode von 700 Å sind noch weitere Formen bekannt, in denen Tropokollagen zur Abscheidung gelangen kann. Versetzt man mit Natriumazetat auf pH 6,5 abgestumpfte Zitratlösungen von Tropokollagen

mit einem Mucopolysaccharid aus Kalbshaut (7,68) oder mit dem α - Glycoproteid aus Serum (69), dann erhält man das sogenannte "Long Spacing Collagen (LS)" mit einer Periode von etwa 2500 bis 3000 Å. Die gleiche Form wird auch bei der Abscheidung mit Heparin, Hyaluronsäure und Chondroitinschwefelsäure (68) erhalten. Ähnliche "Long Spacing Fibrillen" mit einer Periode von allerdings nur etwa 1000 Å haben Hofmann und Kühn (70) gefunden, als sie Tropokollagenlösungen gegen Wasser dialysierten, das ausgefallene Gel mit Zitratpuffer von pH 3,8 aufnahmen und erneut dialysierten.

Schließlich erhält man aus Tropokollagenlösungen in Gegenwart von Nucleinsäuren oder ATP kurze Faserstücke mit hochunterteilter Querstreifung, die von Schmitt und Mitarbeitern (8) als "Segmented Long Spacing Collagen (SLS)" bezeichnet wurden. Ihre Länge entspricht 2800 Å, ist also im Gegensatz zur Identitätsperiode von Kollagen (700 Å) mit der Länge des Tropokollagens identisch. Die Querstreifung der Teilchen ist über die ganze Länge unregelmäßig.

Alle diese Arten lassen sich unter dem Elektronenmikroskop deutlich unterscheiden. Es ist weiterhin gelungen, diese verschiedenen Erscheinungsformen des Kollagens ineinander überzuführen(18). Die Bildung von SLS-Kollagen läßt sich nach Schmitt zwanglos damit erklären, daß sich Kollagen-Monomere parallel nebeneinanderlegen. Die Querstreifung dieser Segmente dürfte daher ein echtes Abbild der Aminosäuresequenz des Tropokollagenmoleküls selbst darstellen. Im FLS-Kollagen, das ein symmetrisches Querstreifungsmuster aufweist, sollen die Tropokollagenteilchen dagegen antiparallel angeordnet sein.

Bei der normalen Faserbildung scheiden sich die Molekülfäden des Tropokollagens (Kettenlänge 2800 Å) als Kollagen mit der Faserperiode von etwa 700 Å ab. Eine Erklärung für diesen Befund bietet die Hypothese von der gestaffelten Anordnung der Tropokollagen-Makromoleküle in benachbarten Prototibrillen, die 1954 erstmals von Schmitt, Gross und Highberger (18) aufgestellt worden ist. Diese Autoren stellen sich die Bildung der nativen

Kollagenfibrillen derart vor, daß sich Protofibrillen, die als lineare Ketten-Polymere eines monomeren Makromoleküls, des Tropokollagens, aufzufassen sind, seitlich aneinanderlagern. Einander benachbarte Protofibrillen sind in der Kollagenfaser so angeordnet, daß die Tropokollagen-Monomeren der einen Protofibrille gegenüber den Tropokollagen-Monomeren der benachbarten um ein Viertel einer Tropokollagenlänge verschoben sind. Dadurch kommt die Periodizität der natürlichen Kollagenfibrille von etwa $700 \text{ \AA}$ zustande, die man im Röntgendiagramm und im Elektronenmikroskop beobachtet. Diese Vorstellung konnte von Kühn (91) mittlerweile durch eine photometrische Analyse des Querstreifungsmusters von SLS-Collagen gestützt werden. Einen weiteren Beitrag zu dieser Vorstellung bringt eine neuere Arbeit von Kühn (92), der verschiedene Anhäufungen von basischen und sauren Aminosäuren an bestimmten Stellen dieser Segmente nachweisen konnte, wodurch bei der Kristallisation zwangsläufig eine gegenseitige Versetzung der Tropokollagenmoleküle um ein Viertel ihrer Länge erzwungen wird.

Doty und Nishihara (72) sowie Hodge und Schmitt (67) behandelten Tropokollagenlösungen mit Ultraschall und fanden dabei eine Aufspaltung des Kollagenmonomeren in vier voneinander verschiedene Untereinheiten, welche jeweils nur ein Viertel der Länge des ursprünglichen Makromoleküls besaßen. Diese Untereinheiten weisen eine deutliche elektronenmikroskopische Querstreifung auf. Sie liegen also offenbar noch in nativer Form vor, das heißt, die Anordnung der Dreierspiralen ist nicht zerstört.

Nach Meinung zahlreicher Autoren (93) kommt die Querstreifung des Kollagens durch das Vorliegen geordneter und weniger geordneter Bereiche in der Kollagenfibrille zustande. Die geordneten Bereiche bestehen weitgehend aus apolaren Aminosäuren, vor allem Glycin, Prolin und Hydroxyprolin in wahrscheinlich ziemlich regelmäßiger Anordnung. In den weniger geordneten Bereichen finden sich dagegen große und sperrige Aminosäuren, darunter auch die Aminodicarbonsäuren und basischen Aminosäuren. Bei der Behandlung

mit Phosphorwolframsäure (58), welche als Fixiermittel bei der Elektronenmikroskopie verwendet wird, bindet sich dieselbe an die Argininreste des Kollagens und lagert sich damit in die weniger geordneten Bereiche ein. Diese erscheinen im elektronenmikroskopischen Bild als Dunkelstreifen, während die geordneten Bereiche die Hellteile darstellen. Die Prolin enthaltenden geordneten Bereiche drücken dem Kollagen seine Struktur auf.

Natives Tropokollagen soll nach Rich und Crick (95) aus drei linksgewundenen Peptidschrauben aufgebaut sein, welche eine Ganghöhe von drei Aminosäuren ($8,58 \text{ \AA}$) aufweisen. Einer Aminosäure kommt demnach eine Länge von $2,86 \text{ \AA}$ zu, welche aus röntgenoptischen Daten gemessen worden ist. Die drei Peptidschrauben sind durch Wasserstoffbrücken verbunden und außerdem in einer übergeordneten rechtsgewundenen Schraube miteinander verdreht, derart, daß nach 10 Aminosäuren ($28,6 \text{ \AA}$) ein Drittel einer Windung erreicht ist, wodurch eine identische Lage zustandekommt.

Denaturiert man Tropokollagenlösungen durch Erwärmen auf 37°C , so findet man in der Ultrazentrifuge zwei Komponenten, denen Molekulargewichte von 120 000 und 240 000 zugeordnet wurden (72). Bringt man die Lösungen in Gegenwart von 2 m KCNS auf pH 12, so verschwindet die dimere Komponente und erscheint auch dann nicht wieder, wenn man gegen neutrale Puffer dialysiert. Dieser Ergebnis wird damit gedeutet, daß sich beim Denaturieren die drei Peptidketten des Kollagens auseinanderwickeln. Zwei davon dürften jedoch noch hauptvalenzmäßig zusammenhängen (Molekulargewicht 240 000), während eine allein vorliegt (Molekulargewicht 120 000). Die Verbindung der dimeren Kette wird bei pH 12 in Gegenwart von 2 m KCNS gelöst.

Bereits zur Faser geformtes Tropokollagen (Prokollagen) geht beim Erwärmen auf 37°C in gelatinöser Form in Lösung. Reifes Kollagen dagegen wird erst bei $62-64^{\circ}\text{C}$ denaturiert. Dabei geht es nicht in Lösung, sondern schrumpft nur zu einer gummiähnlichen Masse zusammen. Prokollagen und Kollagen unterscheiden sich auch in Bezug auf ihre Löslichkeit in Wasserstoffbrücken sprengenden Agentien (konzentrierte Lösungen von KCNS, LiCl,

Harnstoff, Phenol (34). Während Prokollagen unter Denaturierung in Lösung geht, bleibt Kollagen vollkommen unangegriffen (96).

In den letzten Jahren ist daher von einer Reihe von Autoren (22, 23, 24) die Möglichkeit in Erwägung gezogen worden, daß das Gefüge des Kollagens durch Querverbindungen zusammengehalten wird, die fester als die gewöhnlichen Wasserstoffbrücken sind. Diese zusätzlichen Bindungen müssen im Prokollagen fehlen, da dieser Eiweißkörper im Gegensatz zu Kollagen in Wasserstoffbrückenbindungen spaltenden Agentien in Lösung geht (96). Auch der gegenüber Prokollagen wesentlich erhöhte Schrumpfungspunkt von Kollagen läßt sich damit erklären. Nach Vorstellungen von Gustavson (24) soll es sich bei diesen Querverbindungen um Esterbindungen handeln, die als Brücken von den Carboxylen der Dicarbonsäuren zu den Oxygruppen einer benachbarten Peptidkette des Kollagens gedacht sind. Daß solche Esterbindungen im Spiel sein können, die beim Erhitzen aufgespalten werden, wird aus der Zunahme des Bindungsvermögens für basische Farbstoffe (42) und basische Chromkomplexe (43) bei längerem Erhitzen von Kollagen und aus dem Alkalibindungsvermögen von Gelatine (44) geschlossen, das gegenüber demjenigen des Kollagens um einen Betrag erhöht ist, der nicht allein aus der Abspaltung des Amid-Stickstoff erklärt werden kann.

Die Möglichkeit der Mitwirkung von Kohlenhydraten an der Entstehung und Verfestigung der Kollagenfaser ist in der letzten Zeit viel diskutiert worden. Über die Art der Bindung der Zucker an das Eiweiß ist allerdings bis jetzt in der Literatur wenig bekannt geworden. Nach einer von Schneider (13) entwickelten Vorstellung sollten die Polypeptidketten des Kollagens durch kurze Zuckerbrücken getrennt sein, die einerseits esterartig mit den Carboxylen, andererseits N-glykosidisch mit den Aminogruppen der Peptidketten verknüpft sind. Diese Annahme scheint jedoch nach Befunden von Graßmann, Hörmann u. Hafter (14) nicht zuzutreffen. Diese Autoren fanden, daß die Kohlenhydrate des Kollagens mit Phenylhydrazin keine Osazonreaktion geben, während N-Glykoside und auch Zucker mit freien reduzierenden Gruppen

eine positive Reaktion geben. Diese Ergebnisse beweisen, daß die Kohlenhydrate des Kollagens nicht mit den Aminogruppen des Eiweißes N-glykosidisch verbunden sein können, sondern daß sie wahrscheinlich in O-glykosidischer Bindung vorliegen. Dagegen spricht das Verhalten des Kollagens beim reduzierenden Abbau mit LiBH_4 (16) für das Vorliegen einer esterartigen Verknüpfung bestimmter Aminosäuren. Graßmann, Endres und Steber (16) hatten bei der Reduktion von Prokollagen mit LiBH_4 und anschließenden Hydrolyse Aminoalkohole erhalten. Müller (46) konnte zeigen, daß durch LiBH_4 α -Carboxylgruppen von Glutaminsäureresten des Kollagens zu Alkoholgruppen reduziert werden. Ihre Menge entsprach 1,5 Mol pro 100 Mole Aminosäuren. Weitere Hinweise für das Vorliegen von Esterbindungen in denaturiertem Prokollagen und in Gelatine hat Gallop (22) erbracht, als er beim Umsatz mit Hydroxylamin eine Bildung von Hydroxamsäuren beobachtete. Gleichzeitig nahm das Molekulargewicht des denaturierten Prokollagens auf etwa 20 000 ab. Die Menge der Hydroxamsäuren entsprach nach seinen Versuchen etwa 1 Mol pro 100 Mole Aminosäuren.

Weiterhin erscheint in diesem Zusammenhang das Verhalten von Kollagen gegenüber Natriumperjodat interessant. Durch dieses Oxydationsmittel, das spezifisch 1,2-Glykolgruppierungen angreift, wird Kollagen bei wenig erhöhter Temperatur (40°C) gelöst. Die Wirkung von Perjodsäure auf Kollagen ist im Folgenden zunächst an Prokollagenlösungen näher untersucht worden. Dabei wurden keine dialysierbaren Produkte und kein Zuwachs an Amino-Stickstoff erhalten. Von den Aminosäuren werden lediglich Hydroxylysin, Tyrosin und Methionin, eventuell auch etwas Histidin in ihren Seitenketten langsam angegriffen. Dagegen werden die Kohlenhydrate des Prokollagens rasch weitgehend zerstört.

Da in der vorliegenden Arbeit den Kohlenhydraten des Kollagens ein erhöhtes Augenmerk gewidmet wird, sei kurz über die bisher bekannten Ergebnisse zu dieser Kollagenkomponente referiert.

Die Kohlenhydrate des Kollagens

Im Jahre 1935 fanden erstmals Graßmann und Schleich (11) im Kollagen eine Kohlenhydratkomponente. Einige Jahre später wiesen

auch Beek et al. (12) im Prokollagen Zucker nach. Der Kohlenhydratgehalt von mehr oder weniger gereinigtem Kollagen ist nach Angaben in der Literatur verhältnismäßig gering. Gefunden wurden etwa 0,5-1,0 Gew.% Hexosen (19), unter ihnen Glucose, Galaktose (19), Mannose (51) und Fucose (52), sowie 0,25-0,5 % Glucosamin (53). Die Bestimmung von Uronsäuren ist in diesen geringen Mengen unsicher, weshalb hier auf Angaben verzichtet werden soll. Diese Kohlenhydrate sind zum Teil noch Bestandteile der Zwischensubstanz, ein Teil der Hexosen gehört aber auch der Kollagenfaser selbst an. Im Prokollagen wurde von Wolf (34) nur Glucose neben wenig Mannose und noch weniger Fucose, nicht aber Galaktose nachgewiesen.

Durch intensive Behandlung mit Alkali, zum Beispiel bei der Extraktion mit verdünnter Natronlauge (52) oder beim Äschern (54) wird die Zwischensubstanz aus der Haut herausgelöst. Dabei gehen die Aminosucker vollkommen in Lösung, während die Hexosen nur teilweise entfernt werden können (54). Ein Anteil von etwa 0,4 bis 0,5 Gew.% bleibt als echter Bestandteil der kollagenen Faser zurück. In dem herausgelösten Teil wiederum gehören die Aminosucker und die Neutralzucker verschiedenen Verbindungen an. Aus alkalischen Extrakten von Haut läßt sich nach dem Neutralisieren durch fraktionierte Fällung mit Alkohol eine hexosamin- und uronsäurehaltige Mucopolysaccharidfraktion und eine hexosen- und eiweißhaltige Glykoproteidfraktion gewinnen (52). Die Mucopolysaccharide der Haut ausgewachsener Tiere bestehen zu etwa zwei Drittel aus Chondroitinsulfat B und zu einem Drittel aus Hyaluronsäure (56).

Daß die Hexosamine keine echten Bestandteile des Kollagens sind, läßt sich sehr gut am citratlöslichen Kollagen, dem Prokollagen zeigen (x). Durch mehrmaliges Auflösen und Wiederabscheiden kann man diesen Eiweißkörper vom Hexosamin praktisch vollständig

(x) Anmerkung: In letzter Zeit wurde allerdings von H.Dr.Hannig (98) aus einem Trypsinhydrolysat von Prokollagen ein Peptid isoliert, welches Glucosamin enthält. Die Menge des gefundenen basischen Zuckers würde jedoch nur etwa 0,1 % vom Gesamtprotein betragen

befreien (57). Auch durch Ausschütteln von Prokollagenlösungen mit Chloroform nach Sevag (25) lassen sich diese Aminosucker vollkommen abtrennen (40). Dabei scheidet sich das Eiweiß an der Grenzfläche der beiden flüssigen Phasen ab, während die Kohlenhydrate in Lösung bleiben. Die Hexosen jedoch können nach beiden Verfahren nur zum Teil entfernt werden. Ein Anteil von etwa 0,6 bis 0,7 % bleibt wiederum als echter Bestandteil des Prokollagens gebunden zurück. Der Hexosengehalt des gereinigten Prokollagens ist also kaum höher als der des Kollagens (etwa 0,5 %). Während russische Forscher die Meinung vertreten (59), daß die abtrennbaren Kohlenhydrate des Kollagens für die Ausbildung einer quergestreiften Fibrille notwendig sind, konnte Kühn (40) auch aus Prokollagenlösungen, die auf die oben beschriebene Weise von Aminosuckern und beigemengten Glykoproteiden befreit waren, Prokollagenfibrillen mit deutlicher Querstreifung abscheiden (40). Kohlenhydratablagerungen auf der Faser sind also nicht die eigentliche Ursache der Querstreifung. Die Fibrillen sind aber ungewöhnlich dünn und die Querstreifung ist daher verhältnismäßig kontrastarm. Erst nach Zugabe einer entsprechenden Menge von Mucopolysacchariden erhält man wieder das normale Bild. Nachdem Kühn (58) weiter zeigen konnte, daß die Querstreifung der Kollagenfibrillen auch durch Einlagerung von Verbindungen geringerer Masse, zum Beispiel Chromsalzen, verbessert werden kann, wenn dieselben die Ausbildung einer geordneten Struktur der Faser begünstigen, müssen wir annehmen, daß die Mucopolysaccharide die Abscheidung dickerer und besser geordneter Kollagenfibrillen erleichtern, vielleicht deshalb, weil sie die Abscheidung verzögern. Die Querstreifung wird dadurch kontrastreicher. Wahrscheinlich liegt hier eine Erklärung für die Befunde russischer Autoren (59), die nach Entfernung der Kohlenhydrate keine Querstreifung des Kollagens mehr fanden. Sie waren daher der Meinung, daß die Querstreifung der Kollagenfibrillen durch die gleichmäßige Ablagerung der Kohlenhydrate zustandekommt.

B. Aufgabenstellung

Es ist die Aufgabe dieser Arbeit, einen Beitrag zur Kenntnis der Quervernetzungen zu bringen, die zum Teil für die Unterschiede von Kollagen und Prokollagen verantwortlich sind. Vergleicht man die Löslichkeit von Kollagen und Prokollagen, so stellt man fest, daß Prokollagen im Gegensatz zu Kollagen in typisch Wasserstoffbrückenbindungen spaltenden Lösungsmitteln vollkommen löslich ist. Das bedeutet, daß die Protofibrillen des Prokollagens analog den Peptidketten des Seidenfibroins nur durch Wasserstoffbrücken zusammengehalten werden. Beim Kollagen dagegen müssen zusätzlich kovalente Bindungen an der Quervernetzung beteiligt sein, welche die Unlöslichkeit dieses Eiweißkörpers in den eben zitierten Lösungsmitteln zu erklären vermögen. Im Aufbau der Peptidketten dürften Kollagen und Prokollagen wahrscheinlich identisch sein, da sie sich weder in ihrer Aminosäurezusammensetzung noch in den bisher bekannten Aminosäuresequenzen unterscheiden. Über die Natur der Quervernetzungen des Kollagens ist bis jetzt noch nichts bekannt. Zu ihrer Erforschung ist es notwendig, spezifische Reaktionen zu finden, welche nur die Quervernetzungen spezifisch spalten. Bei der Durchführung dieser Reaktionen sollte Kollagen in einen Eiweißkörper überführt werden, der im wesentlichen dem Prokollagen gleicht. Das derart abgebaute Kollagen müßte also wie das Prokollagen in Wasserstoffbrückenbindungen spaltenden Agentien in Lösung gehen.

Vor der Wahl eines geeigneten Abbauverfahrens war vor allem die Frage zu klären, welcher Art die Quervernetzung der Polypeptidketten in der Kollagenfaser sei. In Weiterentwicklung der Vorstellung von Schneider (13) diskutiert man an unserem Institut eine Quervernetzung der Peptidfasern des Kollagens durch Kohlenhydrate, die einerseits O-glykosidisch, andererseits esterartig mit den Aminosäuren benachbarter Peptidketten im Kollagen verknüpft sind. Um diese Frage zu untersuchen, sollte die Art und Bindungsweise der

der im Kollagen vorkommenden Kohlenhydrate möglichst weitgehend erforscht werden. Die Untersuchungen führten zur Auffindung einer kleinen Menge Desoxyglucose im Kollagen.

In der Perjodatoxydation haben wir nun eine Möglichkeit, 1,2-Glykolgruppierungen spezifisch zu spalten, ein Strukturelement, das für Zucker charakteristisch ist. Über ein solches Experiment hatten bereits 1955 Graßmann und Kühn (17) berichtet. Es gelang, Kollagen nach 5 tägiger Behandlung mit Perjodsäure bis auf einen geringen Rest, der nicht weiter untersucht wurde, bei 40°C in Lösung zu bringen. Diese Reaktion sollte weiter ausgebaut und möglichst bei Zimmertemperatur durchführbar gemacht werden.

Eine Möglichkeit, die Quervernetzungen spezifisch anzugreifen, ergibt sich aus der bereits zitierten Annahme, daß die Kohlenhydratkomponente mit einem Molekülende in esterartiger Bindung an einer Peptidkette haftet. Es mußte also nach einem Verfahren gesucht werden, das es gestattete, Estergruppierungen aufzubrechen, ohne dabei Peptidbindungen anzugreifen. Von den hierfür in Frage kommenden Methoden wurde in Anlehnung an die Arbeiten von Gallop (22) und Lipmann (83) die Hydroxylaminreaktion in die engere Wahl gezogen, weil sie es erlaubt, bei milden Bedingungen zu arbeiten. Dabei war es notwendig, an Hand von Modellsubstanzen erst einmal die Bedingungen zu erproben und vor allem die Spezifität der Umsetzung zu studieren. Darüber hinaus sollten quantitative Aussagen über die Reaktion von Hydroxylamin mit Kollagen gemacht werden.

Da die Menge der im nativen Kollagen gefundenen Kohlenhydrate sehr gering ist, war es wünschenswert, diese anzureichern. Vorhergehende Arbeiten an unserem Institut hatten gezeigt, daß man bei der Verdauung von partiell denaturiertem Kollagen mit Trypsin einen unverdaubaren Rückstand erhält, in dem die Kohlenhydrate angereichert sind (10, 57). Die erhaltenen Rückstände sollten sich zur Untersuchung der Zuckerkomponente des Kollagens besonders eignen.

Schließlich war es wünschenswert, nach einer Methode zu suchen, die es gestattet, geringe Mengen von Kohlenhydraten neben viel Eiweiß, Verhältnisse, wie sie im Kollagen vorliege, zu isolieren.

C. Methodische Entwicklungen

I. Isolierung von Kohlenhydraten aus zuckerhaltigen Eiweißkörpern mittels Kationenaustauscherhydrolyse

Es ist seit langer Zeit bekannt, daß kohlehydrathaltige Proteine nur mit schlechter Ausbeute an Zuckern und Aminosäuren hydrolysiert werden können. Daher ist auch die anschließende papierchromatographische Trennung und Identifizierung der Aminosäuren bzw. Zucker nur unbefriedigend möglich. Einen Weg zur Hydrolyse von Glykoproteiden, welche eine größere Menge Kohlenhydrate enthalten, bietet die Methode nach Kofrányi (75).

Die Grundlage hierzu bildet die separate Hydrolyse für Kohlenhydrate und Proteine. Man hydrolysiert zuerst mit Säure in Gegenwart eines Katalysators (ZnCl_2 , TiCl_3 , HgCl_2), wobei die Kohlenhydrate zum größten Teil als Monosaccharide, die Eiweißkomponente in Form von Peptiden in Lösung gehen. Letztere werden nach Neuberg (80) mit Quecksilberazetat in sodaalkalischem Medium gefällt. Der so erhaltene Rückstand wird in der üblichen Weise hydrolysiert und chromatographiert.

In unserem Falle handelte es sich um das Problem der papierchromatographischen Trennung von Zuckern eines Eiweißhydrolysates (Kollagen), in welchem neben wenig Kohlenhydraten viele Proteinbausteine vorhanden sind. Um eine solche Trennung zu ermöglichen, bedient man sich zweier Verfahren. Entweder reichert man die Kohlenhydrate des Proteins an, oder man entfernt die störenden Aminosäuren im Hydrolysat mit geeigneten Methoden. Ein Verfahren zur Anreicherung aus zuckerhaltigen Proteinen ist bereits 1929 von Rimington (79) beschrieben worden. Es handelt sich hierbei um eine Partialhydrolyse des Proteids mit 10 %igem Baryt. Die in Lösung gegangenen Kohlenhydrate werden nach Entfernung des ungelösten Anteiles als Bleiammoniumverbindungen gefällt und nach Isolierung mittels CO_2 wieder in Freiheit gesetzt und chromatographiert. Eine elegante Methode zur Entfernung der störenden Proteinbausteine im Eiweißhydrolysat ist von Wolf (34) beschrieben worden. Hierbei wird das Eiweiß sauer hydrolysiert, das Hydrolysat mit dem Sanger'schen

Reagens DNFB umgesetzt, wobei die Proteinbausteine und basischen Zucker in die entsprechenden DNP-Verbindungen übergeführt und an Ionenaustauschersäulen zurückgehalten werden. Das so erhaltene Eluat enthält alle Neutralzucker und kann nach Konzentrieren der Lösung wie üblich chromatographiert werden.

Da die Durchführung dieses Verfahrens leider zeitraubend ist, wurde von mir nach einer Methode gesucht, die ein wesentlich schnelleres Arbeiten gestattet und sich für den qualitativen Nachweis von Zuckern als recht brauchbar erwies. Anlaß zu dieser Entwicklung war die bekannte Tatsache, daß schon ein "Anhydrolysieren" des Eiweißkörpers mit sehr verdünnten Säuren Zucker in nachweisbaren Mengen in Freiheit setzt. Als "schwache Säure" wurde von mir ein Kationenaustauscherharz (s.S.14) in wässriger Suspension verwendet, das in die H^+ -Form gebracht worden war.

Die Verwendung von Austauscherharzen für Hydrolysezwecke ist bereits 1953 von Deatherage et al.(71) beschrieben worden. Diese Autoren haben am Beispiel des Rinderserumalbumins und Edestins zeigen können, daß eine Hydrolyse, die in Gegenwart freier Säure zusätzlich durch Kationenaustauscher katalysiert ist, mit erheblich größerer Reaktionsgeschwindigkeit verläuft als ohne Austauscher.

In einer neueren Arbeit berichten Glegg und Eidinger (76) über die Kationenaustauscherhydrolyse von Polysacchariden. Sie stellten fest, daß hierbei sämtliche zu erwartenden Monosen außer den Ketohexosen im Hydrolysat qualitativ wiedergefunden werden konnten. Als Austauscherharz wurde von den Autoren Permutit Q (sulfoniertes Polystyrolharz) verwendet, der mit HCl in die H^+ -Form gebracht worden war. Die Hydrolysebedingungen wurden an freien Testzuckern (Pentosen, Aldohehexosen, Ketohexosen und Uronsäuren) bei unterschiedlicher Hydrolysezeit und Temperatur studiert. Es zeigte sich, daß alle diese Zucker (auch die Ketohexosen) nach 48 stündiger Hydrolyse bei 22°C qualitativ wiedergefunden wurden. Bei den Bedingungen der Hydrolyse von Polysacchariden jedoch, wobei eine 48 stündige Hydrolyse bei 100°C notwendig ist, konnten Ketohexosen nicht mehr identifiziert werden. In einer späteren Arbeit berichten dieselben Autoren (77), daß auch nach 96 stün-

diger Austauscherhydrolyse bei 100°C die Monosen Galaktose, Glucose, Mannose und Fucose keine nennenswerte Zersetzung erleiden. Diese Zucker konnten auch in Bindegeweben nach vorangegangener Austauscherhydrolyse in quantitativer Ausbeute mit Hilfe einer modifizierten Carbazol-Methode (78) wiedergefunden werden.

Der Unterschied zwischen der von mir beschriebenen Methode und der von Deatherage angewendeten Technik zur Kationenaustauscherhydrolyse von Eiweißkörpern beruht in einer Abweichung der pH-Werte, bei denen die Hydrolyse durchgeführt wird. Während von Deatherage die Spaltung des Eiweißes mit Austauscher in 0,5 n HCl durchgeführt wird, also bei einer relativ hohen Wasserstoffionenkonzentration, arbeite ich mit einem Austauscher, der ebenfalls in der H^+ -Form vorliegt, aber vor der Anwendung bis zum Neutralpunkt sauber ausgewaschen wird. Das bedeutet, daß die Hydrolyse des Eiweißkörpers in völliger Abwesenheit von gelöster Säure oder Lauge ausgeführt wird. Die Verwendung eines solchen nach außen neutralen Austauscherharzes wird auch in den oben zitierten Arbeiten von Glegg et al. beschrieben, welche diese Methode für die Hydrolyse von Polysacchariden ebenfalls mit Erfolg anwenden konnten.

Für den Zweck der Austauscherhydrolyse eignete sich besonders der Dowex 50-X8 (sulfoniertes Polystyrol mit 8 % Divinylbenzol vernetzt), der die notwendigen Temperaturen von 100-105°C ohne Zersetzung verträgt. Die bei der Hydrolyse mitentstandenen Aminosäuren und Peptide werden weitgehend als Kationen am Austauscher zurückgehalten, die Zucker bleiben in der nahezu farblosen Lösung (keine Huminbildung), die auf einfache Art (Abnutschen) vom Austauscherharz getrennt werden kann. Die Lösung kann anschließend im evakuierten Exsikkator in wenigen Stunden über P_2O_5 und KOH zur Trockne gebracht werden und nach Auflösen in geeigneter Konzentration für die papierchromatographische Trennung verwendet werden.

Die bei dieser Arbeitsweise erzielte Ausbeute an Kohlenhydraten betrug bei einem Versuch, in dem Rinderkollagen eingesetzt wurde, 79,3 % der auf Grund der am Kollagen durchgeführten Anthrone-reaktion erwarteten Menge. Hierbei wurden die Hexosen des Kolla-

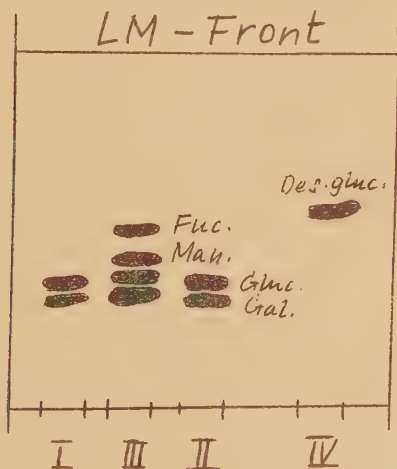
ns und des Hydrolysates mit Anthron quantitativ bestimmt (36).

Tabelle 1: Ausbeuten an Hexosen bei der Hydrolyse von Kollagen mit Dowex 50-X8 (H⁺-Form)

	Hexosen	
	Gew. %	Ausbeute %
Rinderkollagen	0,45	104,0
Hydrolysat		82,5
		79,3

Hydrolysebedingungen: 800 mg Dowex 50-X8/2 ml wässr. Suspension
Zeit: 24 Stunden bei 105°C; Einwaage: 23,9 mg
Kollagen. Bedingungen d. Anthronreaktion s. Vers. 3

Abbildung 1: Papierchromatographische Trennung eines Kollagenhydrolysates



aufgetragen

- I 3,05 mg { Kollagen nach
- II 9,25 mg { Kat. Aust. Hydr.
- III 0,2 μMol Galaktose, Glucose, Mannose u. Fucose
- IV 0,2 μMol 2-Desoxyglucose

Hydrolysebedingungen:

800 mg Dowex 50-X8/ 2 ml H₂O
24 Std. bei 105°C

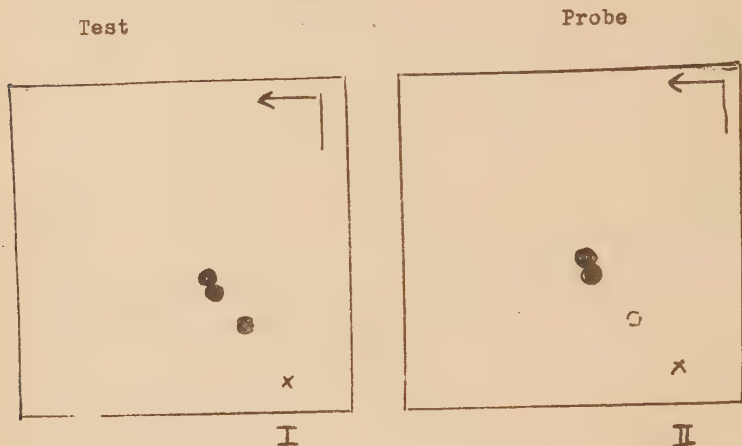
Lösungsmittel: But/Pyr/W=6:4:3

Sprühreagens: Anilinphthalat

Nachdem bekannt ist, daß auch Glykosidbindungen schon durch schwache Säuren hydrolysiert sind, war es naheliegend, diese Methode auch an Disacchariden auszuprobieren. Als Modellsubstanz wurde Lactose verwendet. Da sich die zu erwartenden Monosen Galaktose und Glucose bei dem beschriebenen Lösungsmittelgemisch in den R_F-Werten nur sehr wenig unterscheiden, wurde zweidimensional mit dem gleichen Lösungsmittel chromatographiert (35).

Man kann dem Chromatogramm (Abbildung 2) entnehmen, daß die Lactose weitgehend, jedoch nicht ganz vollständig hydrolysiert wurde.

Abbildung 2: Papierchromatographische Trennung eines Lactosehydrolysates



aufgetragen:

I je 0,2 μ Mol Glucose, Galaktose, II 2 μ Mol Lactose nach Kationenaustauscherhydrolyse

Hydrolysebedingungen:

800 mg Dowex 50-X8 / 2 ml wässriger Suspension, 105°C, 24 Std.

II. Spektralphotometrische Untersuchungen von Kohlenhydraten.

Die Bestimmung der Kohlenhydrate des Kollagens war in vorangegangenen Arbeiten an unserem Institut (34,17) stets kolorimetrisch nach der Anthronmethode (36) ausgeführt worden, wobei die Extinktionswerte bei 2 verschiedenen Wellenlängen (625 m μ und 700 m μ , Glucose Maximum u. Minimum) bestimmt worden sind. Da jedoch im Laufe der Untersuchungen gelegentlich auch andere Farbtönungen bei der Anthronreaktion beobachtet wurden, schien es mir wichtig, die gesamten Spektren aufzunehmen.- Das von Dreywood (37) erstmals beschriebene "Anthron" (9-Oxo-Anthracen-Dihydrid-9-10) hat sich als Reagens für die quantitative Zuckeranalyse sehr bewährt. Besonders die von Yemm u. Willis (36) beschriebene Modifikation scheint sich ihrer Einfachheit und Präzision wegen in neuerer Zeit immer mehr durchzusetzen. Wie Köhler (38)

Tabelle 2: Unterscheidung von Zuckerklassen mit der Anthronmethode

Literatur	Zucker	Reaktionsgeschwindigkeit (Max. Farbentwicklung bei 100°C)	Stabilität der Farbe	Absorptions= maximum der Reaktionslösung	Farbe der Lösung
Yemm u. Willis(36)	<u>Aldohexosen</u>				
	Glucose	8 - 11 Minuten			
	Galaktose	6 - 9 "			
	Mannose	6 - 9 "	stabil	625 m ^m	grün
	Glycogen	8 - 11 "			
Köhler (38)	Amylose	8 - 11 "			
Yemm u. Wallis(36)	<u>Ketohexosen</u>				
	Fructose	1 - 2 Minuten			
	Sorbose	1 - 2 "	stabil	625 m ^m	grün
	<u>Pentosen</u>				
	Arabinose	2 Minuten			
	Ribose	1,5- 2 "			
	Xylose	1,5 "	verschwindet nach 5 Min.	600 m ^m	
	Ribonucleinsäure	2 "			
	<u>Desoxyzucker</u>				
	Desoxypentosen	6 - 10 Minuten			
Köhler (38)	Desoxyglucose	8 - 11 "	stabil	ca 550 m ^m 520 m ^m	rosa
eigener Befund	Mischung aus Glucose und 2-Desoxyglucose	8 - 11 Minuten	stabil	625 m ^m und 520 m ^m	grauviolett(x)
(x) je nach dem Verhältnis von Glucose u. Desoxyglucose mit grünem oder rotem Farbstich					

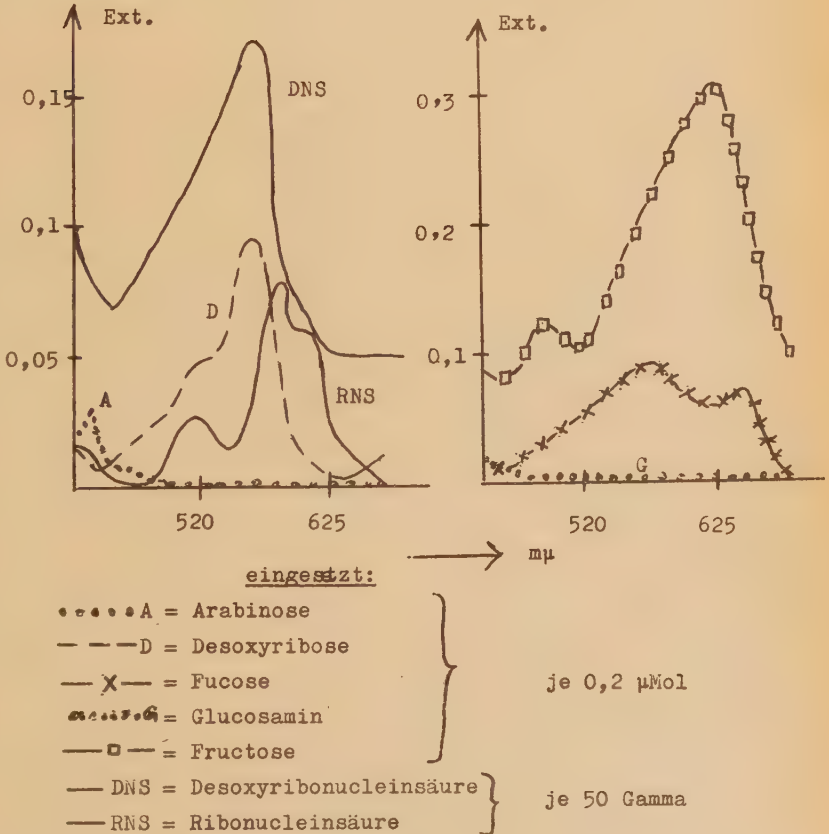
zeigen konnte, gestattet die Anthronmethode nicht nur die quantitative Bestimmung neutraler Hexosen, sondern auch eine Unterscheidung verschiedener Kohlenhydratklassen, die sich auf Grund der unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeit, der Farbintensität und des Farbcharakters ergeben. Diese Befunde der Literatur sind der besseren Übersicht halber in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, werden bei der üblichen Zuckerbestimmung nach Yemm u. Willis (36), wobei ein 10 Minuten langes Kochen der Reaktionslösung vorgeschrieben ist, nur die Aldohe= xosen, Ketohexosen und Desoxyzucker, sowie alle diese Zucker in Form von Polysacchariden, Glykosiden und Zuckerestern, erfaßt. Aldo= hexosen, Ketohexosen und Desoxyzucker bilden bei dieser Reaktion Farbmaxima in verschiedenen Spektralbereichen und können damit un= unterschieden werden. Bei den Pentosen dagegen ist das Maximum der Farbintensität bereits nach 1-2 Minuten erreicht und sinkt dann nach weiterem Kochen innerhalb von 5 Minuten bis auf einen zu vernach= lässigenden Wert ab. Außer den Pentosen zeigen auch Hexosamine, Uronsäurelactone, Uronsäuren, Aldonsäuren, Zuckerdicarbonsäuren und Zuckeralkohole keine oder nur höchstens 4 % der Färbung einer gleichen Menge Glucose (39).

Es ist weiter zu entnehmen, daß bei entsprechender Änderung der Reaktionsbedingung, kurzes Kochen (1-2 Minuten) und sofortige Abkühlung der Reaktionslösung, auch die Pentosen erfaßbar sind.

Bei der spektralphotometrischen Untersuchung der Anthronre= aktion verschiedener Kollagenabbauprodukte stieß ich auf Reakti= onslösungen, welche neben dem von Glucose herrührenden Maximum bei 625 m μ noch zusätzlich eines bei 520 m μ aufwiesen (S.32). Um die dazugehörige Zuckerkomponente zu identifizieren, wurden die bei der Anthronreaktion auftretenden Spektren sämtlicher mir zur Ver= fügung stehender Zucker aufgenommen (Abb.3). Ein entsprechendes Maximum wurde bei der 2-Desoxyglucose gefunden (Abb.4). RNS und Desoxyribose zeigen ebenfalls ein schwaches Maximum bzw. eine schwache Schulter bei 520 m μ , doch findet man daneben ein stärker ausgeprägtes längerwelligeres Maximum bei 550 m μ bzw. 570 m μ .

Abbildung 3: Absorptionsspektren von Arabinose, Desoxyribose, DNS, RNS, Fucose, Fructose, Glucosamin nach Umsetzung mit Anthron

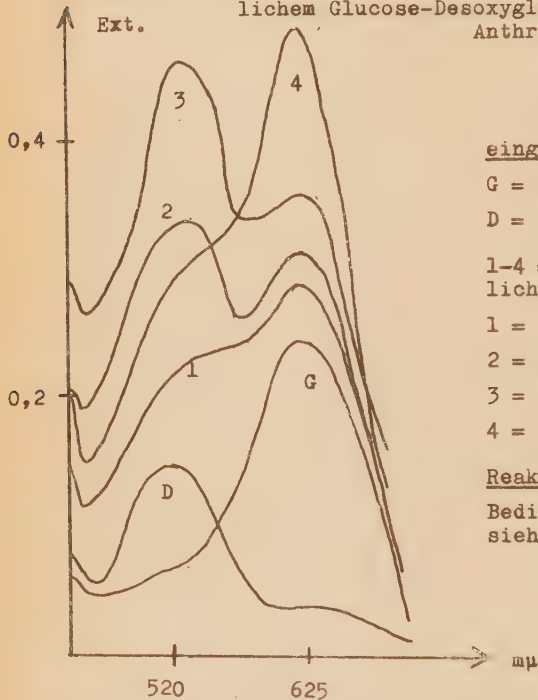


Reaktionszeit: 10 Minuten. Bedingungen der Farbreaktion s.Vers.3

Es war weiterhin notwendig, die Absorptionsspektren von Testmischungen mit wechselndem Gehalt an Glucose und Desoxyglucose nach Umsetzung mit Anthron aufzunehmen, da durch das Auftreten eines

neuen Maximums bei der Anthronreaktion eines Kollagenabbauproduktes im Bereich um 520 m μ die auf Glucose bezogenen Werte zu korrigieren sind.

Abbildung 4: Absorptionsspektren von Testmischungen mit unterschiedlichem Glucose-Desoxyglucosegehalt nach Umsetzung mit Anthron



eingestzt:

G = Glucose

D = Desoxyglucose

} je 0,2 μ Mol

1-4 = Testmischungen mit unterschiedlichem Glucose-Desoxyglucosegehalt

1 = 0,2 μ Mol Gluc + 0,2 μ Mol Des.gluc.

2 = 0,2 μ Mol " + 0,4 μ Mol "

3 = 0,2 μ Mol " + 0,6 μ Mol "

4 = 0,4 μ Mol " + 0,2 μ Mol "

Reaktionszeit: 10 Minuten

Bedingungen der Anthronreaktion
siehe Vers.Nr.3

III. Die Bestimmung von Estergruppierungen mit Hydroxylamin

Für die quantitative Bestimmung von Estergruppierungen hat sich in der letzten Zeit besonders die Hydroxylaminreaktion (22, 48) durchgesetzt. Die Methode beruht darauf, daß Hydroxylamin in alkalischer Lösung mit den Estergruppierungen von Karbonsäuren unter Bildung von Hydroxamsäuren reagiert, die mit Eisen-III-chlorid den bekannten blutroten Farbkomplex bilden, der kolori=

metrisch für die quantitative Bestimmung ausgewertet werden kann.

Die Umsetzung von Estern mit Hydroxylamin wurde bis vor kurzem (vergl. Goddu (15)) in ziemlich stark alkalischer nichtwässriger Lösung durchgeführt. Bei neutralen Bedingungen (pH mit Phenolphthalein als Indikator eingestellt) sollen im allgemeinen nur aktivierte Ester und Säureanhydride reagieren, sodaß es nach Angaben von Goddu et al. (15) unter neutralen Bedingungen sogar möglich ist, Säureanhydride und aktivierte Karboxylgruppen in Gegenwart normaler Säureester zu bestimmen. Nach Befunden von Raacke (49) sind dagegen Ester von Aminosäuren im allgemeinen labiler als gewöhnliche Karbonsäureester und reagieren deshalb bereits in schwächer alkalischem Medium mit Hydroxylamin. Dieser Autor konnte zeigen, daß die Hydroxamsäurebildung aus Leucylmethylester in einem pH-Bereich zwischen 7 und 9 mit außerordentlicher Geschwindigkeit verläuft. Unter pH 7 ist die Hydroxamsäurebildung unvollständig und oberhalb pH 9 macht sich bereits eine Hydrolyse des Reaktionsproduktes bemerkbar.

Neben Estern reagieren auch eine Reihe anderer Verbindungen mit Hydroxylamin. Williams und Mitarbeiter (86) fanden, daß gewisse δ -Glutamylpeptide von Hydroxylamin angegriffen werden (pH 8,5 bei 37°C, 2 Std.). Eine Reihe von Gruppierungen, von denen man erwarten kann, daß sie von Hydroxylamin angegriffen werden, haben Gallop und Mitarbeiter (22) zusammengestellt. Unter ihnen sind Ester und Imide ($R-CO-NH-CO-R'$) zu nennen. Auch die Reaktionsfähigkeit von Anhydriden und verwandten Verbindungen war oben bereits erwähnt worden.

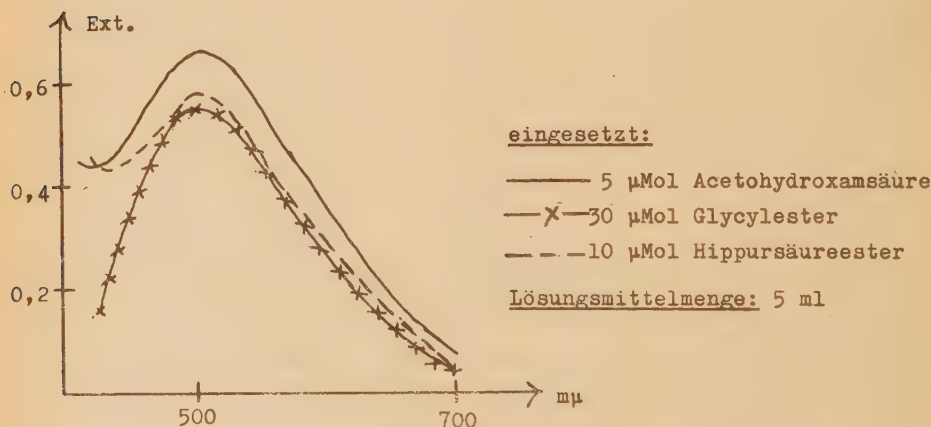
Auf Grund dieser teilweise sogar widersprechenden Angaben der Literatur schien es uns wünschenswert, die Umsetzung von Hydroxylamin mit verschiedenen Estern näher zu untersuchen.

1.) Zur Messung des Fe-Hydroxamsäurekomplexes

Bei der Durchführung der Farbreaktion von Hydroxamsäuren mit Fe-III-chlorid arbeitete ich in Anlehnung an eine Vorschrift von Lipmann und Tuttle (83). Abbildung 5 gibt das Absorptionsspektrum der Fe^{+++} -Reaktion verschiedener Hydroxamsäuren wieder. Sämtliche

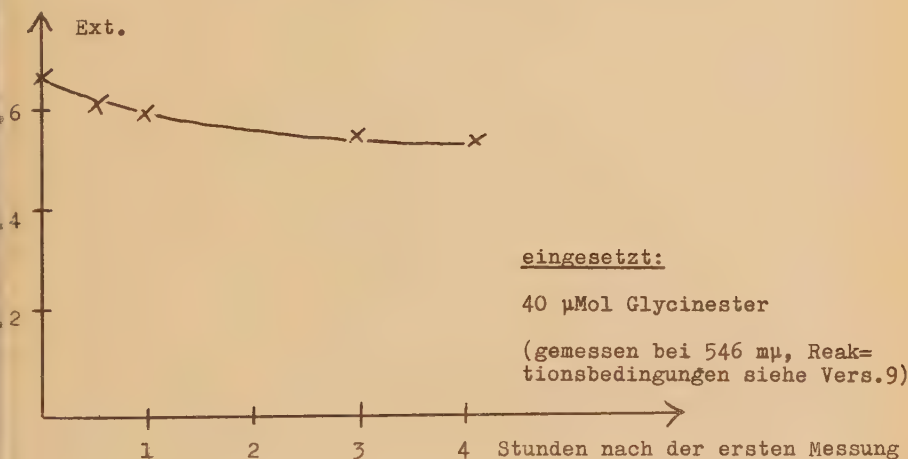
Kurven weisen ein Maximum bei 500 m μ auf. In Abweichung zur Arbeitsweise anderer Autoren, welche die Reaktionslösungen bei 546 m μ kolorimetrieren, habe ich daher Absorptionsmessungen bei 500 m μ und 700 m μ durchgeführt (Abb.5) und die Differenz der Extinktionen der beiden Wellenlängen ausgewertet.

Abbildung 5: Absorptionsspektren von Fe-Hydroxamiden aus Acetohydroxamsäure und Hydroxamsäuren, dargestellt durch Umsetzung von Glycyl- und Hippursäureester mit Hydroxylamin (Reaktionsbedingungen siehe Versuch Nr.9)



Es zeigte sich, daß die kolorimetrische Messung der Fe-Hydroxamide unmittelbar nach der Fe-III-chlorid Zugabe zu erfolgen hat, da die Farbintensität der Lösung schon nach kurzer Zeit um einen nicht zu vernachlässigenden Wert absinkt (Abbildung 6).

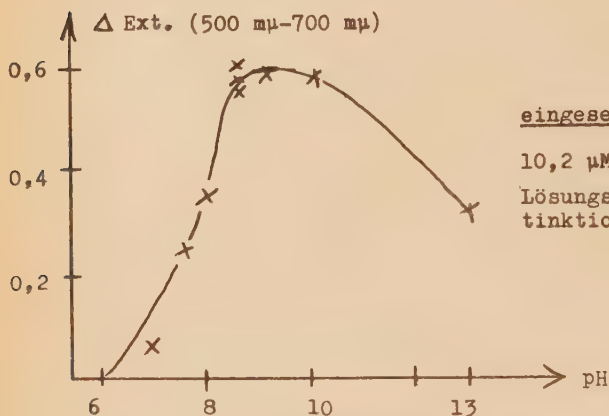
Abbildung 6: Abnahme der Farbtiefe einer Fe-Hydroxamidlösung aus Glycinerster



2.) pH-Abhängigkeit der Umsetzung von Estern mit Hydroxylamin

Auf Grund der widersprechenden Angaben in der Literatur erschien es wünschenswert, den günstigsten pH-Bereich der Umsetzung von Estern mit Hydroxylamin zu ermitteln. Wie man Abbildung 7 entnehmen kann, findet man bei 2 stündiger Einwirkung des Hydroxylamins (0,75 m) zwischen pH 8,5 und 10,0 eine maximale Hydroxamsäurebildung. Bei noch höherem pH sinkt die Ausbeute an Hydroxamsäuren wieder ab. Offenbar verläuft die Hydrolyse der Esterbindung, welche mit der Hydroxamsäurebildung parallel geht, bei höheren pH-Werten mit größerer Geschwindigkeit. Als mildeste Bedingung, unter der die Hydroxylaminreaktion mit maximaler Ausbeute durchgeführt werden kann, erscheint nach diesem Versuch pH 8,5.

Abbildung 7: pH-Abhängigkeit der Umsetzung von Estern mit Hydroxylamin (Reaktionsbedingungen: 3 ml 0,75 m NH_2OH , 37°C, 2 Std., dann Zusatz von 1 ml 3 n HCl + 1 ml 4 %ige FeCl_3 -Lös.)



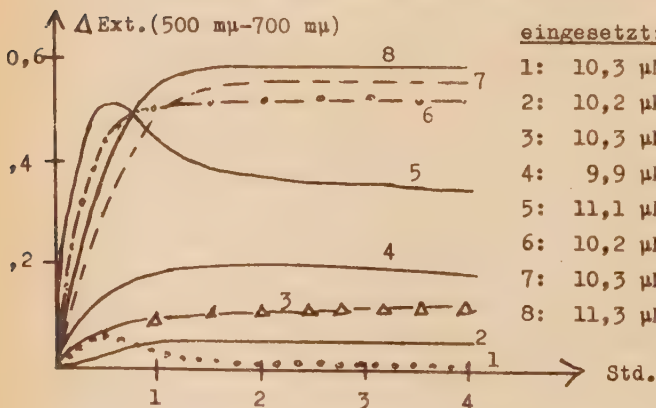
eingesetzt:

10,2 μMol Hippursäureäthylester
Lösungsmittelvolumen bei der Extinktionsmessung: 5 ml

3.) Ermittlung der Reaktionszeit

Ein weiterer Schritt zur Überprüfung der Brauchbarkeit der Hydroxylaminmethode war die Bestimmung der Reaktionszeit. Die Methode ist nur dann für eine quantitative Bestimmung geeignet, wenn die Umsetzung zwischen Hydroxylamin und Estergruppierungen nach einer experimentell zu handhabenden Zeit einem Endpunkt zustrebt.

Abbildung 8: Zeitabhängigkeit der Umsetzung von Estern mit Hydroxylamin (Reaktionsbedingungen: 3 ml 0,75 m NH_2OH , 37°C pH 8,5. Dann Zusatz von 1 ml 3n HCl + 1 ml 4% ige FeCl_3 -Lös.)



eingesetzt:

- 1: 10,3 μMol Glu- γ -OCH₃
- 2: 10,2 μMol OH.Pro-OCH₃
- 3: 10,3 μMol Gly-OCH₃
- 4: 9,9 μMol His-OCH₃
- 5: 11,1 μMol Pro-Gly-OCH₃
- 6: 10,2 μMol Hipp-O-C₂H₅
- 7: 10,3 μMol Na.Tol.sulf.Arg-OCH₃
- 8: 11,3 μMol Gly-Gly-Pro-OCH₃

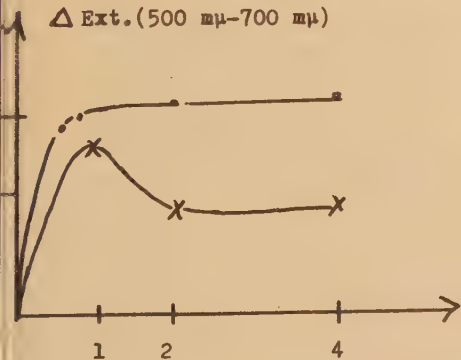
In Abbildung 8 ist die Bildung von Hydroxamsäuren aus verschiede-

nen freien und Aminoende geschützten Aminosäureestern, sowie von einem Tripeptidester an Hand der Fe^{+++} - Reaktion zeitlich verfolgt. Auf Grund meiner vorangegangenen Versuche, die im pH-Bereich von 8,5 eine optimale Umsetzung von Aminosäureestern mit Hydroxylamin zeigten, führte ich die Reaktion bei diesem pH durch. Man erkennt, daß die Umsetzung in den meisten Fällen innerhalb von 1 Stunde zu einem konstanten Endwert gelangt. Lediglich Prolyglycylmethylester und Glutaminsäure-methylester zeigen einen Abfall der Hydroxamsäureausbeute bei längerer Reaktionszeit. Offenbar finden hier Sekundärreaktionen statt wie Cyklisierung zum Diketopiperazin oder Bildung von Pyrrolidoncarbonsäureestern.

Führt man die Hydroxylaminreaktion bei tieferem pH durch (siehe Abb.9), so findet man bei der Umsetzung von Hippursäureäthylester bei pH 7,5 nach etwa 1 Stunde eine größere Hydroxamsäureausbeute als nach 2 Stunden. Offenbar muß man auch hier mit Sekundärreaktionen rechnen (Lossen'scher Abbau?).

Abbildung 9: Bildung von Hydroxamsäure aus Hippursäureäthylester bei der Umsetzung von Hippursäureester mit Hydroxylamin bei pH 7,5 und pH 8,5. Abhängigkeit der Ausbeute von der Reaktionszeit. (Bedingungen: 3 ml 0,75 M NH_4OH , pH 7,5 und 8,5. 37°C. Dann Zusatz von 1 ml 3N HCl + 1 ml 4%ige $FeCl_3$ -Lös.)

Δ Ext. (500 m μ -700 m μ)



eingesetzt:

je 10,2 μ Mol Hippursäureäthylester

Lösungsmittelvolumen bei der Extinktionsmessung: 5 ml

pH 7,5

pH 8,5

— x —

— . . —

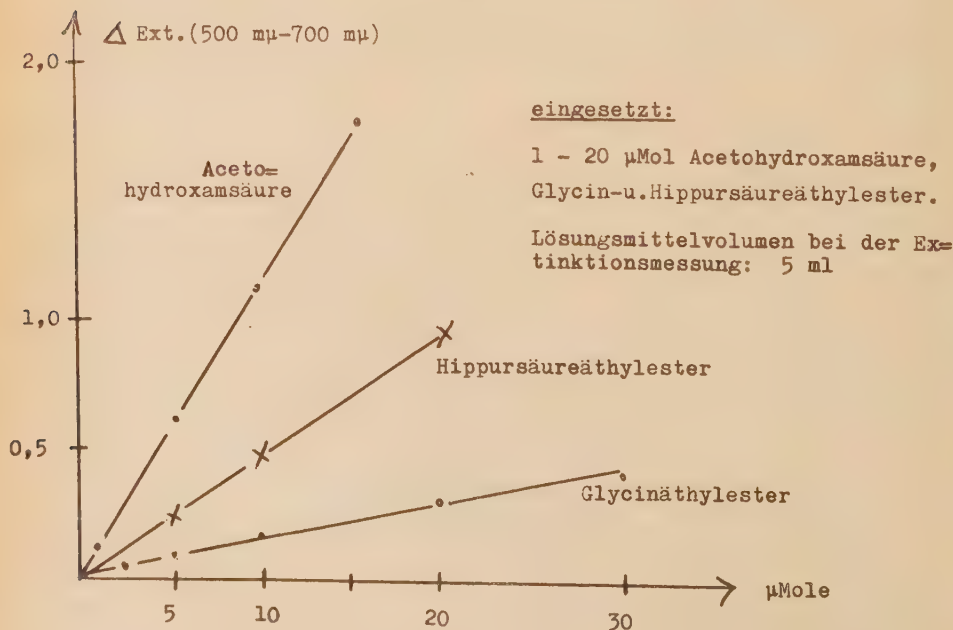
Std.

4.) Ausbeute an Hydroxamsäuren

In Abbildung 10 ist die Farbtiefe synthetisch hergestellter

Acetohydroxamsäure mit der von Glycinäthylester und Hippursäureäthylester nach Umsetzung mit Hydroxylamin verglichen. Man ersieht, daß etwa die 6 fache Menge Glycinester und etwa die 2 fache Menge Hippursäureester beim Umsatz mit Hydroxylamin dieselbe Farbinintensität wie Acetohydroxamsäure liefern. Unter der plausiblen Annahme, daß die Extinktionswerte der verschiedenen Hydroxamsäuren nicht wesentlich unterschiedlich sind (vergl. Abb. 8) wird man schließen dürfen, daß die Ausbeute an Hydroxamsäuren bei der Umsetzung von Estern mit Hydroxylamin nicht vollständig ist. Bei reinen Aminosäureestern ist sie außerdem noch wesentlich niedriger als bei N-geschützten Aminosäureestern und Peptidestern. Als Konkurrenzreaktion ist wohl eine Hydrolyse der Ester in Betracht zu ziehen. Im Falle der freien Ester ist weiterhin zu berücksichtigen, daß dieselben im angegebenen pH-Bereich eine Cyclisierung zum Diketopiperazin erleiden können, wodurch die Ausbeute an Hydroxamsäuren noch weiter erniedrigt wird.

Abbildung 10: Eichkurve von Fe-Hydroxamiden aus Acetohydroxamsäure, Glycin- und Hippursäureester. (Bedingungen: siehe Vers. Nr. 9)

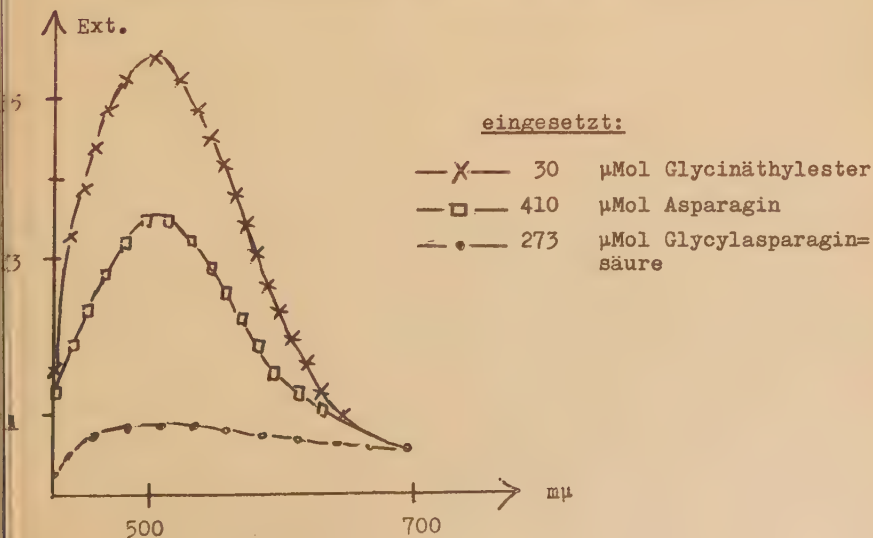


Wie man Abb.8 entnehmen kann, führt die Umsetzung von geschützten Aminosäure- und Peptidestern (Kurve 6,7,8) mit Hydroxylamin stets zu etwa gleichen Ausbeuten an Hydroxamsäuren. Bei diesen Substanzen sind am wenigsten Nebenreaktionen zu erwarten. Einfache Aminosäureester und Dipeptidester können dagegen Nebenreaktionen eingehen, die Ausbeuten an Hydroxamsäuren sind dadurch wesentlich geringer. Es erscheint daher richtig, die Umsetzung von acylierten Aminosäureestern als Vergleichswert für die kolorimetrische Esterbestimmung über Hydroxamsäuren auszuwählen. In den Versuchen zur Bestimmung der Estergruppen des Kollagens wurde Hippursäureäthylester als Bezugssubstanz gewählt.

5.) Spezifität der Hydroxamsäurebildung

Vor Anwendung der Methode auf Eiweißkörper schien es mir von Bedeutung festzustellen, wieweit die Hydroxaminierungsreaktion spezifisch für Ester ist und bis zu welchem Maß auch Peptidbindungen und Säureamide an der Umsetzung teilhaben. In Abbildung 11 ist die Farbreaktion von Glycylasparaginsäure und Asparagin mit der des Glycinäthylesters verglichen.

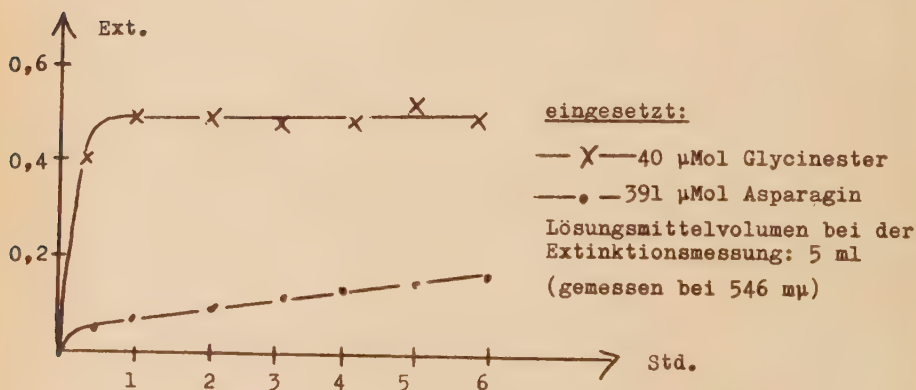
Abbildung 11: Absorptionsspektren von Fe-Hydroxamiden aus Asparagin, Glycinester und Glycylasparaginsäure (Zeit der Umsetzung mit Hydroxylamin: 2 Std. bei 37°C, pH 8 - 9)



Man ersieht, daß nach 2 Std. bei pH 8,5 etwa die 25 fache Menge Asparagin und etwa die 40 fache Menge Glycylasparaginsäure beim Umsatz mit Hydroxylamin dieselbe Farbintensität wie Glycinäthylester geben, der seinerseits wieder eine viel geringere Reaktion als Hippursäureäthylester und Tripeptidester gibt.

In Abbildung 12 ist der zeitliche Verlauf der Hydroxamsäurebildung von Glycinäthylester mit einer etwa 10 mal so großen Menge Asparagin bei pH 8 - 9 verglichen. Während die Reaktion von Glycinäthylester innerhalb von etwa 1 Stunde einen konstanten Endwert erreicht, verläuft die Reaktion von Asparagin außerordentlich langsam und gelangt in kurzer Zeit zu keinem Endwert.

Abbildung 12: Bildung von Hydroxamsäuren in Abhängigkeit der Zeit
(Reaktionsbedingungen: 3 ml 0,75 m NH_2OH , pH 8-9, dann Zusatz von 1 ml 3n HCl + 1 ml 4%ige FeCl_3 -Lös.)



In Tabelle 3 sind die auf 1 Mol Ester bzw. Säureamid bezogenen Absorptionswerte nach 2 stündiger Umsetzung mit Hydroxylamin und Fe^{+++} -Zusatz zusammengestellt. Man erkennt, daß Amidbindungen nur unwesentlich, Peptidbindungen praktisch garnicht an der Umsetzung teilhaben.

Tabelle 3: Hydroxamsäurebildung bei der Umsetzung von Estern und Amiden. Extinktionswerte auf molare Konzentrationen bezogen. (Bedingungen des Hydroxylaminumsatzes: pH 8,5. 2 Std., 37°C)

	dExt. 500 mμ-700 mμ
Acetohydroxamsäure	595
Hippursäureäthylester	240
Nα.Toluolsulf.Arg.methylester	265
Glycylglycylprolinmethylester	240
Prolylglycinmethylester	180
Glycinäthylester	80
Histidinmethylester	73
Hydroxyprolinmethylester	23
Glutaminsäure-γ-methylester	5
Asparagin	4,1
Glycylasparaginsäure	1,6

D. Ergebnisse dieser Dissertation

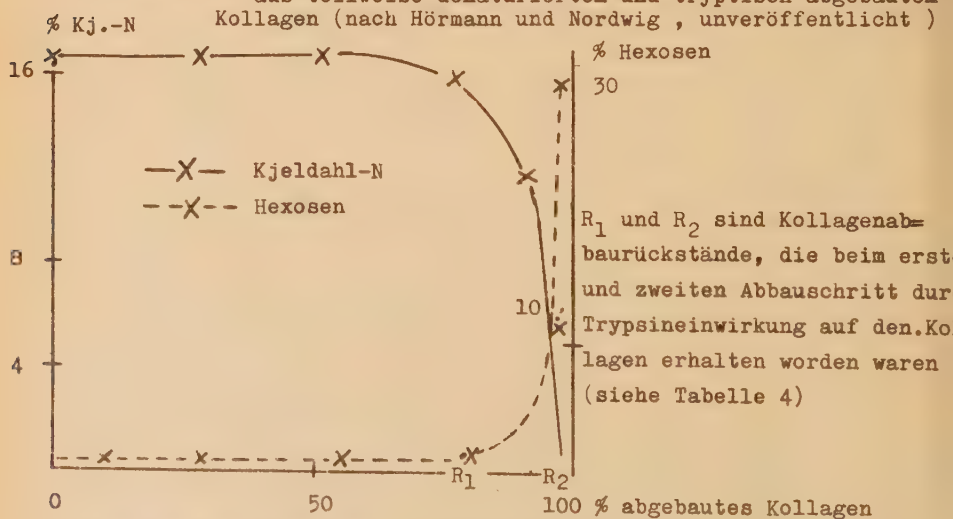
I. Stufenweiser Abbau von denaturiertem Kollagen mit Trypsin und Anreicherung der Kohlenhydrate

Wird Kollagen durch Hitzeeinwirkung nur teilweise denaturiert, so werden nach älteren Befunden von Graßmann (28) bei einer nachfolgenden Trypsinverdauung nur die denaturierten Anteile aufgelöst, die nativ gebliebenen hinterbleiben als pulveriger Rückstand (R_1). Durch nachfolgendes Denaturieren dieses Restes wird dann ein weiterer Teil angreifbar. Es bleibt aber immer wieder ein Rückstand (R_2). Die Untersuchung dieser Rückstände ist an unserem Institut von verschiedenen Seiten in Angriff genommen worden (Graßmann, Wolf, Hörmann und Nordwig). In diesen Resten sind die Neutralzucker des Koll-

lagens angereichert. Sie sind umso stickstoffärmer bzw. kohlenhydratreicher, je weiter der Abbau fortgeschritten ist.

In Abbildung 13 ist der Stickstoff- und Hexosengehalt verschiedener trypsinresistenter Kollagenrückstände in Abhängigkeit vom Abbaugrad angegeben. Daraus ist zu entnehmen, daß eine wesentliche Veränderung der Zucker- und Kjeldahlstickstoffwerte erst ab etwa 90 %ig abgebautem Kollagen in Erscheinung tritt. Um einen Kohlenhydratanreicherungsrückstand mit möglichst hohem Zuckergehalt zu bekommen, muß der Abbau also weitgehendst fortgeschritten sein. Im allgemeinen erhält man Kohlenhydratanreicherungsrückstände mit durchschnittlich 7 - 15 Gwe.% Hexosengehalt, in besonders weit abgebauten Fällen sogar bis zu etwa 30 % (29).

Abbildung 13: Kjeldahlstickstoff- und Hexosengehalt von Rückständen aus teilweise denaturiertem und tryptisch abgebautem Kollagen (nach Hörmann und Nordwig, unveröffentlicht)



An Aminosäuren findet man in diesen Rückständen sämtliche des Kollagens in wenig verändertem Mengenverhältnis. Aminozucker sind nicht angereichert (x)

(x) Anmerkung: Die entsprechenden Untersuchungen wurden an diesem Institut von H.Dr.Hörmann u.H.Nordwig ausgeführt. Ich möchte daher in meiner Arbeit auf die Wiedergabe der Versuchsbelege verzichten.

II. Kohlenhydrat-Stickstoffbilanz eines Trypsinabbaugemisches von denaturiertem Kollagen

Im Folgenden wurde die Anreicherung von Kohlenhydraten in den angreifbaren Rückständen, welche nach der Trypsinverdauung von teilweise hitzedenaturiertem Kollagen hinterblieben, systematisch verfolgt. Der Abbau mit Trypsin wurde in diesem Versuch zweimal durchgeführt und zwischen beiden Enzymeinwirkungen das Ungelöste das Ungelöste ein zweitesmal denaturiert. Um die Trypsinverdauung des Kollagens analytisch zu verfolgen, wurden bei jedem Abbauschritt sowohl vom Rückstand als auch von der dazugehörenden Abbaulösung Kjeldahlstickstoff- und Zuckerbestimmungen durchgeführt (36). Dieser Versuch ist zur besseren Übersicht halber durch ein Schema wiedergegeben:

Kollagen(K) 1.Abbaustufe → Rückstand (R_1) + Abbaulösung (L_1)
 Rückstand (R_1) 2.Abbaustufe → Rückstand (R_2) + Abbaulösung (L_2)

Kollagen (K) 1.und 2.Abbaustufe → Rückstand (R_2) und Abbaulösungen(L_1+L_2)

In Tabelle 4 ist die Kjeldahlstickstoff- und Kohlenhydratbilanz eines stufenweisen Abbaues von teilweise denaturiertem Kollagen mit Trypsin wiedergegeben.

Tabelle 4: Zucker- und Kjeldahlstickstoffbilanz beim mehrmaligen Abbau von teilweise denaturiertem Kollagen mit Trypsin

	Trocken-Gew.		Stickstoff		Hexosen	
	mg	%	mg	%	mg	%
Kollagen	3262	100	533	16,3	14,7	0,43
Rückstand R_1	687,7	21,5	105	15,3	4,9	0,71
1.Abbaulösung L_1	2574,0	78,5	425	16,5	9,5	0,37
Summe	3261,7		530		14,4	
Rückstand R_2	64,9	2,0	2,9	4,5	6,4	10,0
2.Abbaulösung L_2	600,0	18,5	85,8	14,3	1,3	0,23
Summe	649,9		88,7		7,7	

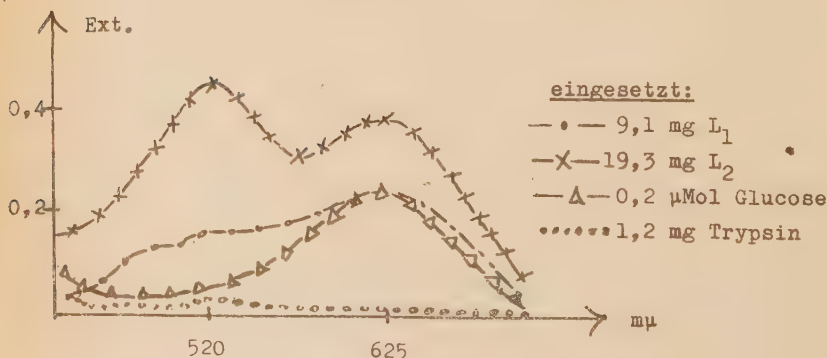
Denaturierungsbedingungen: 1. 65°C, 10 Min. 2. 80°C, 10 Min.
 Trypsinabbau: 50 mg Trypsin in 50 ml. pH 7,8. 38°C. 48 Stunden

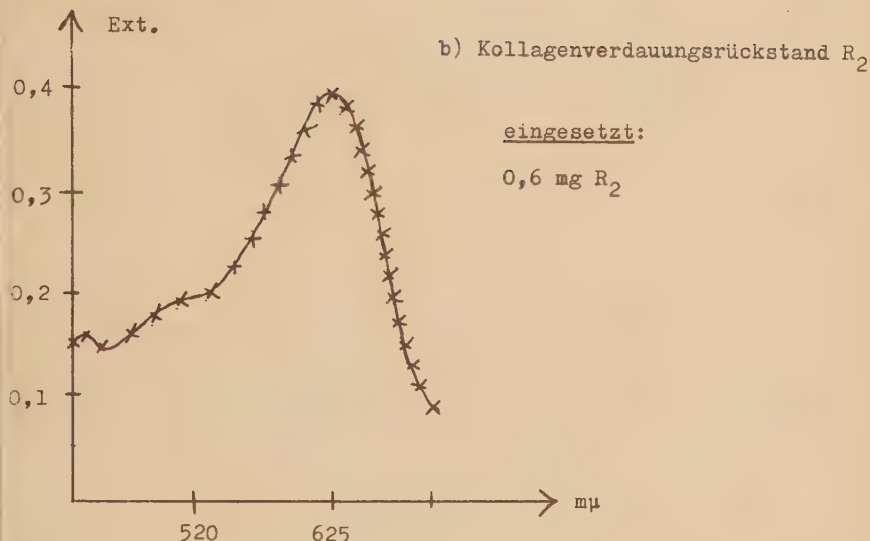
Während die Auswertung der Stickstoffbestimmungen zu einem befriedigenden Ergebnis führte, zeigte die Zuckerbilanz des zweiten Trypsinabbaus eine größere Abweichung. Außerdem trat bei der Zuckerbestimmung der zweiten Abbaulösung L_2 ein anderer Farbton auf als bei der Zuckerbestimmung von Ausgangskollagen (K). In R_2 wurde dagegen die übliche grüne Farbe beobachtet. Es ist zu vermuten, daß die geringere Genauigkeit der Hexosenbestimmung in diesem zweiten Abbauschritt auf Schwierigkeiten in der Auswertung der Farbreaktion führt.

Die Tatsache, daß die Anthronreaktion von L_2 einen anderen Farbton aufwies, legt die Vermutung nahe, daß in dieser Lösung neben den üblichen Hexosen eine Verbindung vorliegt, die ebenfalls mit Anthron reagiert, jedoch zu einer anderen Farbtönung führt. Um dieser Verbindung nachzuspüren, wurden die Absorptionsspektren der Trypsinabbauprodukte des ersten und zweiten Abbauschrittes nach Umsetzung mit Anthron aufgenommen (Abb.14).

Abbildung 14: Absorptionsspektren von Kollagenabbauprodukten nach Umsetzung mit Anthron (L_1 , L_2 und R_2 sind Kollagenabbauprodukte, die beim 1. und 2. Abbauschritt nach Tabelle 4 erhalten worden waren)

a) Kollagenabbaulösungen L_1 und L_2



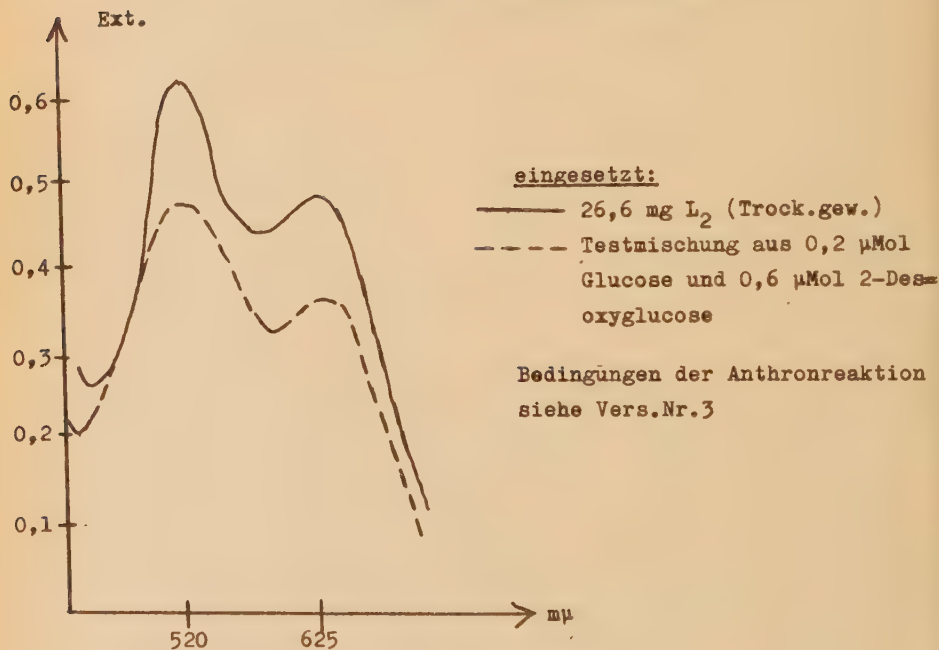


Bedingungen der Anthronreaktion s.Vers.Nr.3

Es zeigte sich im Spektrum der ersten Abbaulösung L_1 neben einem Maximum bei 625 mμ, das durch das Vorhandensein von Hexosen bedingt ist, zusätzlich eine Schulter, deren Gipfel bei 520 mμ liegt. Diese Schulter wird in L_2 zu einem Maximum. Bei R_2 jedoch ist die Absorption bei 520 mμ nur sehr gering. Ein Kurvenzug mit einem Maximum bei 520 mμ ist nach Köhler (38) der Anthronreaktion von 2-Desoxyglucose zuzuordnen (bezüglich Versuchen zur Identifizierung von Desoxyglucose siehe Seite 39). Die Anthronreaktion einer Trypsinmenge, wie sie in L_2 vorhanden ist, weist keine nennenswerte Extinktion bei 520 mμ auf (Abb. 14a).

Um die genaue Menge Glucose und 2-Desoxyglucose in L_2 bestimmen zu können, wurden Testmischungen mit unterschiedlichem Glucose-Desoxyglucosegehalt (s.Seite 20) hergestellt und die nach Umsetzung mit Anthron gemessenen Absorptionsspektren dieser Testmischungen mit denen der Kollagenabbauprodukte verglichen.

Abbildung 15: Gegenüberstellung der Absorptionsspektren einer durch Trypsinverdauung erhaltenen Kollagenabbau L_2 und einer Testmischung aus 0,2 μMol Glucose und 0,6 μMol Desoxyglucose



Der Verlauf des Kurvenzuges einer Testmischung von Glucose und 2-Desoxyglucose im Verhältnis 1:3 stimmt mit dem aus L_2 erhaltenen befriedigend überein. Es erscheint mir deshalb richtig, dieses Vergleichsspektrum für die Berechnung der Glucose- und Desoxyglucosewerte von L_2 zu Grunde zu legen. Daraus ergeben sich neue Glucosewerte (Tabelle 5). In gleicher Weise wurde die Korrektur der Zuckerwerte für den durch Trypsinabbau erhaltenen Kollagenverdauungsrückstand R_2 durchgeführt.

Tabelle 5: Zuckerbilanz eines Trypsinabbaugemisches von denaturiertem Kollagen (bezogen auf eine Einwaage v.3,262 g Koll.)

Abbauprodukt	ursprünglich gefundene Glucose (Tab. 4)		korrigierte Glucosewerte		Verhältnis Des.gluc./Gluc.	Desoxygluc.	
	mg	Gew.%	mg	Gew.%		mg	Gew.
K	14,7	0,43					
L ₁	9,5	0,37	9,5	0,37			
L ₂	1,3	0,23	0,3	0,05	3 : 1	0,95	0,16
R ₂	6,4	10,00	5,1	7,86	1 : 4	1,25	1,94
Summe	17,2		14,9			2,20	

Die in Tabelle 5 wiedergegebene Zuckerbilanz (+ 2 % Hexosen) gibt nun eine befriedigende Übereinstimmung mit den ursprünglich im Kollagen vorkommenden Hexosen. Auch die Summe der Hexosen von L₂ und R₂ (5,4 mg) stimmt mit dem Wert von R₁ (4,9 mg) noch hinreichend gut überein. Desoxyglucose ist vermutlich im Ausgangskollagen nicht erfaßbar und kann erst nach Trypsinbehandlung nachgewiesen werden.

Abschließend läßt sich aussagen, daß die Gesamtbilanz nach Durchführung einer Korrektur für die Zuckerwerte zu einem befriedigenden Ergebnis geführt hat. Die Kjeldahlstickstoff- und Hexosenwerte für die Kollagenverdauungsrückstände R₁ und R₂ passen gut in die Ergebnisse von Herrn Nordwig, die im Diagramm (Abb.13) wiedergegeben sind.

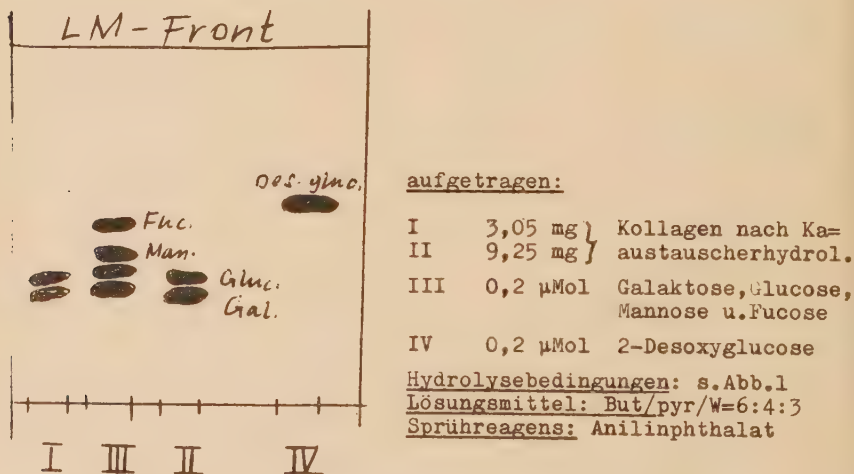
III. Identifizierung der Neutralzucker des Kollagens nach erfolgter Kationenaustauscherhydrolyse

Während im vorangegangenen Abschnitt quantitative Aussagen über die Kohlenhydratkomponente des Kollagens gemacht wurden, sollen in diesem Kapitel Versuche zur Identifizierung der neuen Zuckerkomponente, die im Ausgangskollagen vermutlich nicht erfaßbar ist, und eine Überprüfung der bereits bekannten Zucker des Kollagens beschrieben

ben werden.

Als Untersuchungsmaterialien wurden Ausgangskollagen und Kollagenabbauprodukte (Kohlenhydratanreicherungsrückstand und die dazugehörige Abbaulösung, welche durch Einwirkung von Trypsin auf hitzedenaturisiertes Kollagen erhalten worden waren) verwendet. Die kohlenhydrathaltigen Eiweißkörper wurden dabei wie im Abschnitt Methodische Entwicklungen (s.S.12) beschrieben, mit einem Kationenaustauscher hydrolysiert und die in Lösung gegangenen Neutralzucker papierchromatographisch aufgetrennt.

Abbildung 16: Identifizierung der Zucker des Ausgangskollagens

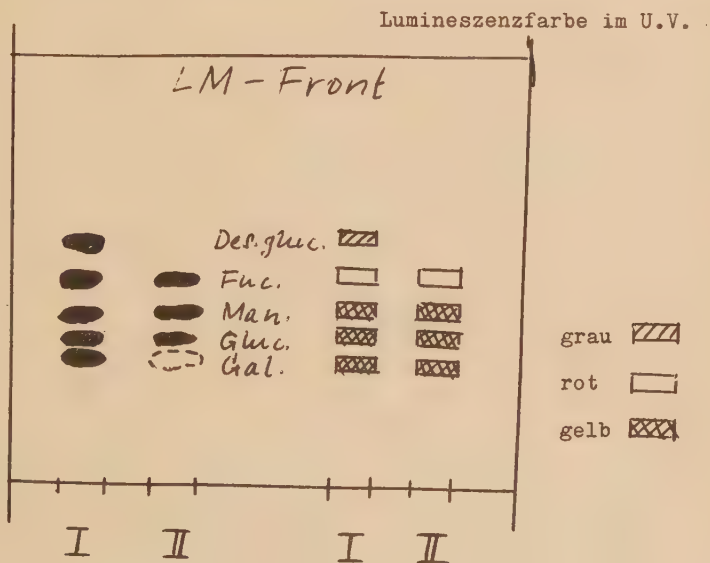


Die im Chromatogramm (Abb.16) der Kohlenhydrate des Ausgangskollagens gefundenen Flecke sind der Galaktose und Glucose zuzuordnen. Mannose und Fucose konnten wahrscheinlich wegen ihrer geringen Menge nicht gefunden werden.

Im Chromatogramm (Abb.17) der Kohlenhydrate von R₂ fanden sich dagegen Fucose, Mannose und Glucose. Galaktose ist in sehr geringer Menge vorhanden und konnte nur im U.V.-Licht auf Grund der Lumineszenz

zenzfarbe erkannt werden. In R_2 sind also offenbar Mannose und Fucose gegenüber dem Ausgangskollagen stärker angereichert als Glucose und Galaktose.

Abbildung 17: Identifizierung der Zucker eines Kohlenhydratanreicherungsproduktes R_2 , das durch Einwirkung von Trypsin auf denaturisiertes Kollagen erhalten worden war



aufgetragen: I je 0,2 μ Mol Galaktose, Glucose, Mannose, Fucose und 2-Desoxyglucose

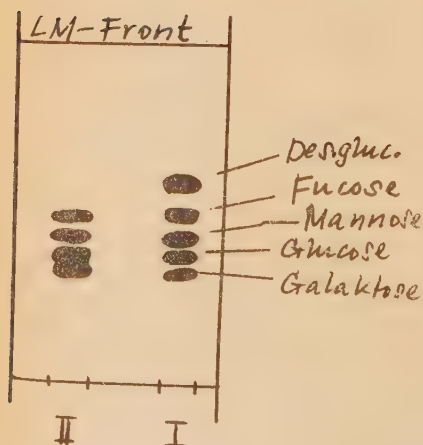
II 0,9 mg Kohlenhydratanreicherungsrückstand R_2

Hydrolysebedingungen: siehe Abb.1. Sprühreagens: Anilinphthalat

Lösungsmittel: But/Pyr/W = 6:4:3

Die im Chromatogramm (Abb.18) von L₂ gefundenen Flecke sind der Galaktose, Glucose, Mannose und Fucose zuzuordnen. Die von mir vermutete 2-Desoxyglucose konnte nicht gefunden werden. Dieser Zucker wird nämlich, wie ein Testversuch ergab (Abb.19), selbst bei der schonenden Bedingung der Austauschhydrolyse bei 100°C und auch bei Zimmertemperatur zerstört und bleibt als Abbauprodukt an der Auftragstelle sitzen.

Abbildung 18: Identifizierung der Zucker der Kollagenabbaulösung L₂, welche durch Einwirkung von Trypsin auf hitzedenaturiertes Kollagen erhalten worden war



aufgetragen:

- I je 0,2 µMol Galaktose, Glucose, Mannose, Fucose und 2-Desoxyglucose
- II Kollagenabbaulösung L₂ (40 mg) nach Kat.Aust.Hydrolyse

Hydrolysebedingungen: s.Abb.1

Lösungsmittel: But/Pyr/W=6:4:3

Sprühreagens: Anilinphthalat

Bildung 19: Papierchromatographische Untersuchung der 2-Desoxyglucose nach erfolgter Austauscherhydrolyse



aufgetragen:

I	0,4 μ Mol	} Desoxyglucose nach Aust. Hydrol.
II	1,6 μ Mol	
III	0,2 μ Mol	unbehandelte Desoxyglucose

Hydrolysebedingungen: s. Abb. 1

Lösungsmittel: But/Pyr/W=6:4:3

Sprühreagens: Anilinphtalat

Wie aus Tabelle 2 (S.17) ersichtlich ist, kann es sich bei der neuen Zuckerkomponente auf Grund der Spezifität der Anthronreaktion nur um Hexosen oder Desoxyzucker handeln, da bei den Bedingungen der Methode nur diese Zucker erfaßt werden können. Daß es sich nicht allein um Hexosen handelt, ist bereits an der Farbe der Reaktionslösung erkennbar. Während reine Desoxyzucker rosarot, reine Hexosen nach Umsetzung mit Anthron grün gefärbt sind, zeigte die mit dem Reagens umgesetzte Abbaulösung L_2 des Kollagens eine typische Reaktionsfarbe, die auch bei den Testmischungen aus Zuckern mit unter niedrigem Glucose-Desoxyglucosegehalt beobachtet werden konnte. Daß es sich bei den Desoxyzuckern nicht um Desoxypentosen handelt, ergibt sich aus der Lage des gefundenen Absorptionsmaximums. Während nämlich die Desoxypentosen um 550 m μ absorbieren, habe ich bei der untersuchten Probe ein Maximum bei 520 m μ gefunden, welches nach Köhler (38) der 2-Desoxyglucose zuzuordnen ist.

Stellt man weiter die Absorptionsspektren der durch Trypsinverdauung erhaltenen Kollagenabbaulösung L_2 einer Testmischung aus 0,2 μ Mol Glucose und 0,6 μ Mol Desoxyglucose nach Umsetzung mit Anthron gegenüber, so ist eine fast quantitative Übereinstimmung beider Kurvenzüge erkennbar. (vergl. Abb. 15 S. 34) Ein weiterer Beweis für die Anwesenheit von Desoxyzucker in L_2 ist der positive Ausfall der Farbreaktion nach Kiliani und Stoll (60, 61). Bei dieser Reaktion geben Desoxyhexosen und Desoxypentosen eine Blaufärbung, wenn man in Eisessig gelöstes Ferrisulfat und Schwefelsäure zusetzt.

Obwohl der entscheidende Beweis, der papierchromatographische Nachweis, zur Identifizierung der neuen Zuckerkomponente als 2-Desoxyglucose auf Grund der Labilität dieses Kohlenhydrats nicht erbracht werden konnte, dürfte es weitgehend wahrscheinlich sein, daß der Zucker durch die indirekten Nachweise hinreichend charakterisiert ist.

IV. Der Perjodatabbau von Kollagen

Der Perjodatabbau des Kollagens ist in letzter Zeit häufig dazu herangezogen worden, um die Bedeutung des geringen Kohlenhydratanteiles der Faser für ihre Struktur und Stabilität zu untersuchen. Dieses Oxydationsmittel ist spezifisch für die Spaltung von 1,2-Glykolgruppierungen, Strukturelementen, die für Zucker charakteristisch sind. Aus Versuchen von Graßmann u. Kühn (17) war bekannt, daß Kollagen unter der Einwirkung von Perjodat bei wenig erhöhter Temperatur (40°C, pH 8) innerhalb von 5 Tagen in Lösung geht. Sie schlossen daraus, daß Kohlenhydrate ein wesentliches Strukturelement für den Aufbau des Kollagens darstellen. Aus experimentellen Gründen haben Graßmann und Kühn allerdings den größten Teil ihrer Arbeit mit Phenyljodosoazetat anstelle Perjodat durchgeführt, von dem man auf Grund der Arbeiten von Criegee et al. (99) annahm, daß es die gleiche Spezifität wie Perjodat besitzt. Unerwarteterweise erhielten sie dabei jedoch eine wesentlich wei-

tergehende Spaltung des Eiweißmoleküls als es mit Perjodat der Fall war (Hörmann und Fries (17)).

Bei der Oxydation von Prokollagen mit Perjodat in essigsaurer Lösung werden nach Befunden von Hörmann und Fries (17) die Zucker nach etwa 1-2 Stunden zum größten Teil zerstört, ein kleiner Anteil von 0,16 Gew.% bleibt unangegriffen. Von den Aminosäuren des Prokollagens werden bei der Perjodatoxydation nur Hydroxylisin, Tyrosin und Methionin in ihren Seitenketten oxydiert, ohne daß die Peptidkette zerstört wird. Dialysierbare Eiweißbruchstücke und zusätzliche Aminoendgruppen treten dabei nicht auf.

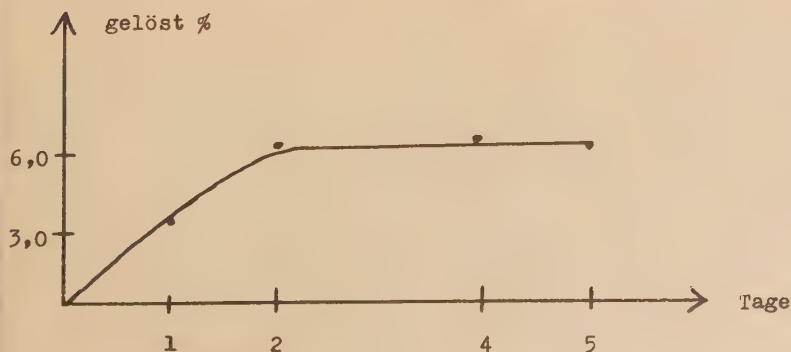
Es war meine Aufgabe, die teils an Prokollagen, teils an Kollagen bekannten Forschungsergebnisse zu koordinieren und weiter auszuwerten, um dadurch ein zufriedenstellendes Bild über den Angriff von Perjodsäure auf Kollagen geben zu können.

1.) Einwirkung von Perjodat auf Kollagen ohne Wasserstoffbrückenbindungen sprengenden Agentien

a) Geschwindigkeit der Reaktion:

Oxydiert man Kollagen bei 20°C mit Perjodsäure in essigsaurer Lösung, so gehen innerhalb von 2 Tagen etwa 6 % des Materials in Lösung. Nach dieser Zeit findet man keine Zunahme des gelösten Anteiles. Von einer Vergleichsprobe in perjodsäurefreier Essigsäure gingen unter den gleichen Bedingungen nur 0,13 % in Lösung.

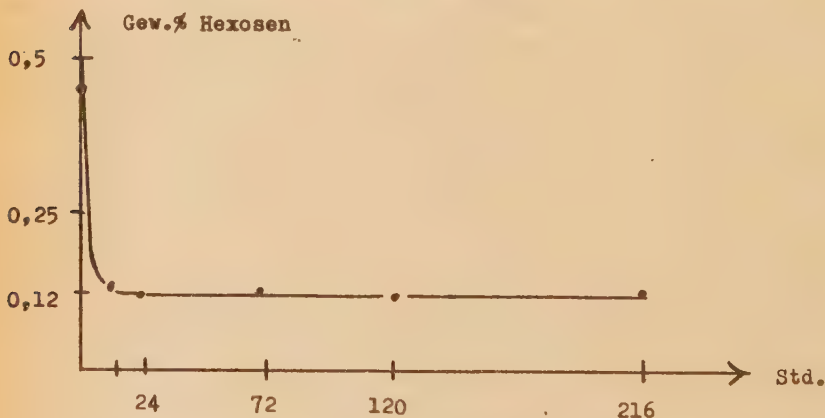
Abbildung 20: Löslichkeit von Kollagen während der Perjodatoxydation bei 20°C in essigsaurem Milieu (Bedingungen siehe Vers.Nr.5)



b) Verhalten der Zucker:

Bei der Oxydation mit Perjodsäure werden die Hexosen des Kollagens innerhalb von etwa 12 Stunden weitgehend zerstört (Abb.21). Ein Anteil von 0,12 Gew.% bleibt jedoch unangegriffen. Die Zerstörung des größten Teils der Kohlenhydrate reicht also nicht aus, Kollagen in Essigsäure löslich zu machen.

Abbildung 21: Abnahme der Hexosen bei der Perjodateinwirkung auf Kollagen



Oxydationsbedingungen: 3 ml 0,02 m NaJO_4 -Lösung. Lösungsmittel: 10 %ige Essigsäure, 20 °C

c) Veränderung der Aminosäuren:

Die in Tabelle 6 aufgeführten Werte zeigen, daß bei der Oxydation von Kollagen mit essigsaurer Perjodsäure wie erwartet die meisten Aminosäuren kaum eine Veränderung erleiden. Glycin wurde relativ erhöht gefunden, Alanin und Hydroxyprolin dagegen niedriger. Hydroxylysin, Methionin und Tyrosin werden an ihren Seitenketten angegriffen und treten nicht mehr auf (vergleuch S.49).

Tabelle 6: Gegenüberstellung der Aminosäurezusammensetzung von Kollagen und perjodatoxydiertem Kollagen (20°C)

(Angabe in Mol% = Mol Aminosäure/100 Mol Aminosäuren)

Aminosäure	Kollagen	Perjodatoxydiertes Kollagen	
		Oxydation in:	
		a) Essigsäure	b) Essigsäure+8m Harnstoff(dialys.)
Asp	5,23	5,14	5,39
Alu	7,33	7,16	6,92
Gly	32,82	35,50	34,20
Ala	11,61	10,99	9,53
Ser	2,40	2,44	2,95
Thr	1,72	1,73	1,68
Gly	0,38	0,05	-
Val	2,02	2,06	1,72
Iset	0,40	-	0,22
Leu	1,29	1,21	1,26
Ileu	2,54	2,45	2,17
Met	1,38	1,11	1,10
Pro	15,91	15,87	17,00
Hy-Pro	6,28	5,36	8,46
Phe	0,68	0,66	0,66
Tyr	2,44	2,69	2,50
Hy-Lys	0,16	-	-
Arg	5,14	5,25	4,25
NH ₂	(5,32)	(6,00)	
Unbekannt	0,27	0,33	
Summe (x)	100,00	100,00	100,00

(x) Anmerkung: NH₂ nicht mitgezählt

Oxydationsbedingungen: a) 10 %ige Essigsäure, 0,02 m NaJO₄ enthaltend. 1 Tag bei 20°C oxydiert. Volumen: 3 ml. b) 10 %ige Essigsäure, 0,02 m NaJO₄ + 8 m Harnstoff enthaltend. 8 Tage bei 20°C oxydiert. Volumen: 3 ml.

d) Der Schrumpfungspunkt von oxydiertem Kollagen:

Wie Kühn (40) am Prokollagen zeigen konnte, wird durch die Perjodatoxydation die Struktur der Faser nicht entscheidend geändert. Es gelang nämlich, Prokollagen nach Oxydation aus verdünnten Essigsäurelösungen wieder auszuscheiden, das unter dem Elektronenmikroskop noch deutlich die charakteristischen Querbanden erkennen ließ. Andererseits fand Jackson (41), daß Kollagen nach Oxydation mit Perjodsäure eine wesentlich tiefere Schrumpfungstemperatur (T_S) aufweist. Diese Angabe kann ich bestätigen.

Tabelle 7: Gegenüberstellung des Schrumpfungspunktes von Kollagen und oxydiertem Kollagen

	Kollagen	oxydiertes Kollagen	
		Oxydationszeit	
		1 Tg.	2 Tg.
T_S	62	54	53
	63	52	52
	63	53	52
Mittelwert	63	53	52

Oxydationsbedingungen: 10 %ige Essigsäure, 0,02 m NaJO_4 enthaltend.
1-2 Tg. bei 20°C

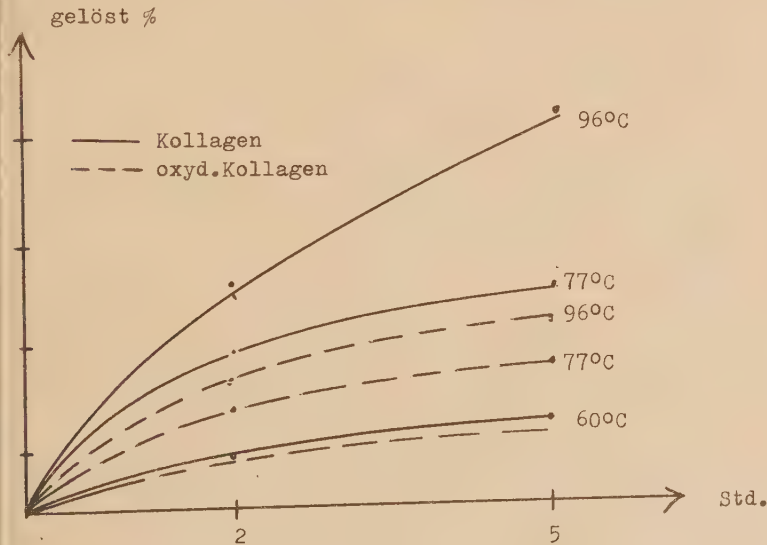
Aus Tabelle 7 ist zu entnehmen, daß der Schrumpfungspunkt von Kollagen nach der Perjodsäureoxydation um etwa 10°C erniedrigt ist.

Eine Erklärung dieses Befundes bietet die Annahme, daß durch den Perjodatangriff zumindest ein Teil der Quervernetzung chemisch so verändert wird, daß die Orientierung der Dreierspiralen gestört ist, was sich durch ein Absinken des Schrumpfungspunktes gegenüber dem Wert für die native Faser bemerkbar macht.

) Löslichkeit des oxydierten Kollagens in Wasser bei erhöhten Temperaturen:

Überraschenderweise ist Kollagen, das mit essigsäurem Perjodat oxydiert worden war, trotz der starken Erniedrigung des Schrumpfungspunktes in heißem Wasser wesentlich weniger löslich als unbeeindeltetes (Abb.22). Möglicherweise reagieren die bei der Perjodat-xydation entstandenen Aldehydgruppen mit anderen funktionellen Gruppen des Kollagens unter Ausbildung von Quervernetzungen und stabilisieren dadurch die Faser.

Abbildung 22: Löslichkeit von oxydiertem Kollagen in Wasser bei erhöhten Temperaturen



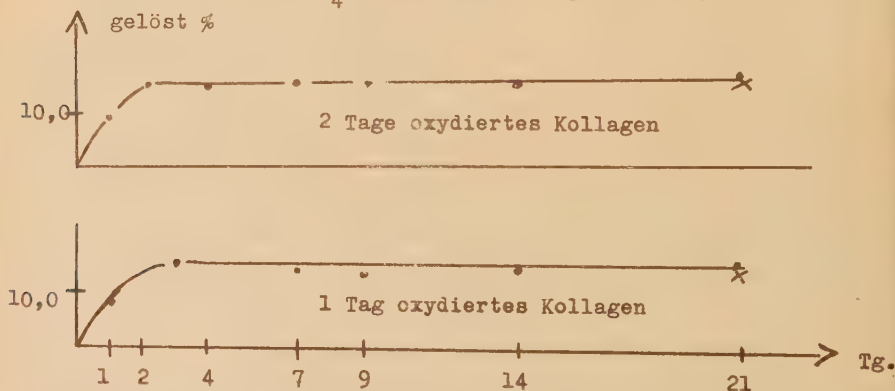
Oxydationsbedingungen: 0,02 m essigsäure NaJO_4 -Lösung (1 Tg. 20°C)
 Bedingungen der Löslichkeitsversuche: 20 mg oxydiertes Kollagen in
 1 ml Wasser

2.) Verhalten des oxydierten Kollagens gegen Wasserstoffbrückenbindungen spaltende Agentien

Wenn unsere Vermutung zutrifft, daß die Quervernetzung der Peptidketten des Kollagens außer durch die Wasserstoffbrücken auch durch Zuckerbrücken erfolgt, so sollte durch Zerstörung der Kohlenhydrate das Kollagen in einen prokollagenähnlichen Eiweißkörper überzuführen sein, der im Gegensatz zu Kollagen in Lösungsmitteln, die Wasserstoffbrückenbindungen zu lösen vermögen, löslich ist.

Wie man Abb.23 entnehmen kann, ist jedoch perjodatoxydiertes Kollagen in konzentrierter Harnstofflösung nur zu etwa 15 % löslich. Von einer unbehandelten Kollagenprobe löste sich nach 21 Tagen etwa gleich viel auf. Durch die Perjodatoxydation wird also Harnstofflöslichkeit ebensowenig erreicht wie die Löslichkeit in Essigsäure (siehe Tabelle 8).

Abbildung 23: Löslichkeit von oxydiertem Kollagen in 8m Harnstofflösung (Oxydationsbedingungen: 10 %ige Essigsäure, 0,02 m NaJO_4 enthaltend, 1-2 Tg. bei 20°C)



Wird dagegen die Perjodatoxydation des Kollagens in Gegenwart von Wasserstoffbrückenbindungen spaltenden Agentien (z.Bsp. 8m Harnstofflösung) durchgeführt, so geht das gesamte Eiweiß in etwa 7 Tagen vollkommen in Lösung (s. Tabelle 8).

Neben der Anwesenheit eines Wasserstoffbrückenbindungen spaltenden Mittels ist offenbar auch die Essigsäurekonzentration im Oxydationsmedium von Bedeutung. In stark verdünnter Essigsäure verläuft die Umsetzung wesentlich langsamer (Tabelle 8).

Tabelle 8: Löslichkeit von Kollagen in Gegenwart von Perjodat (20°C)

Dauer	Einwirkung von	% gelöst
5 Tage	10 %ige Essigsäure	0,1
	10 %ige Essigsäure + $0,02 \text{ m NaJO}_4$	6,0
6 Tage	8 m Harnstoff	0,5
	8 m Harnstoff + $0,02 \text{ m NaJO}_4$	0,5
	8 m Harnstoff + 10 %ige Essigsäure	0,5
	8 m Harnstoff + $0,02 \text{ m NaJO}_4$	99,6
	+ 10 %ige Essigsäure	
7 Tage	0,1 %ige Essigsäure	0,0
	8 m Harnstoff + $0,02 \text{ m NaJO}_4$	35,0
	+ 0,1 %ige Essigsäure	

Eine nacheinanderfolgende Einwirkung von Perjodsäure und von Harnstoff-Essigsäure führt dagegen nicht zur Auflösung von Kollagen (s. Tabelle 9). Es scheint sich also um einen komplizierteren Reaktionsmechanismus zu handeln, bei dem Perjodat und Harnstoff-Essigsäure gemeinsam einwirken müssen (vergl. Diskussion S. 84). Läßt man anschließend die drei Reagentien gemeinsam auf das oxydierte Kollagen einwirken, so geht es in Lösung, allerdings nicht mehr ganz vollständig. Dies weist übereinstimmend mit den Versuchen über die Löslichkeit in heißem Wasser (s. Seite 45, l.e) auf Sekundärreaktionen hin, die zu neuen gegen Perjodat beständigen Quervernetzungen führen. Offenbar handelt es sich dabei um eine Reaktion der bei der Perjodatoxydation entstandenen Aldehydgruppen, ähnlich, wie dies im Falle der Aldehydgerbung schon seit langem bekannt ist.

Tabelle 9: Nacheinanderfolgende Einwirkung von Perjodsäure, Harnstoff-Essigsäure und Perjodsäure-Harnstoff auf Kollagen (20°C)

	Dauer	Einwirkung von	% gelöst
1.	3 Std.	10 %ige Essigsäure + 0,02 m NaJO_4	0,5
2.	6 Tg.	10 %ige Essigsäure + 8 m Harnstoff	6,3
3.	6 Tg.	10 %ige Essigsäure + 0,02 m NaJO_4 + 8 m Harnstoff	49,5
1.	1 Tg.	10 %ige Essigsäure + 0,02 m NaJO_4	3,0
2.	6 Tg.	10 %ige Essigsäure + 8 m Harnstoff	10,1
3.	6 Tg.	10 %ige Essigsäure + 0,02 m NaJO_4 + 8 m Harnstoff	48,5

Oxydiert man Kollagen in bikarbonatalkalischer Lösung (pH 8) in Gegenwart von Harnstoff, so geht nur ein geringer Teil in Lösung (Tabelle 10). Ein weiterer Versuch, in bikarbonatalkalischem Medium oxydiertes Kollagen nacheinander mit Harnstoff/Bikarbonat und Harnstoff/Essigsäure in Lösung zu bringen, führte auch nicht zur Auflösung (Tabelle 11).

Tabelle 10: Löslichkeit v. Kollagen in Gegenwart v. Perjodat (pH 8.20°C)

Dauer	Einwirkung von	% gelöst
14 Tg.	8 m Harnstoff + NaHCO_3	11,2
14 Tg.	8 m Harnstoff + 0,02 m NaJO_4 + NaHCO_3	12,6

Tabelle 11: Nacheinanderfolgende Einwirkung von Perjodat-Bikarbonat, Harnstoff-Bikarbonat und Harnstoff-Essigsäure auf Kollagen (20°C)

	Dauer	Einwirkung von	% gelöst
1.	1,5 Tg.	0,02 m NaJO_4 + NaHCO_3	0,5
2.	7 Tg.	8 m Harnstoff + NaHCO_3	1,4
3.	14 Tg.	8 m Harnstoff + 10 %ige Essigsäure	4,1

Hitzedenaturiertes Kollagen geht in Perjodat-Essigsäure (10 %ig) ohne Zusatz von Harnstoff innerhalb von 10 Tagen bei 20°C vollkommen in Lösung.

Tabelle 12: Löslichkeit von hitzedenaturiertem Kollagen in Gegenwart von Perjodat (20°C)

Dauer	Einwirkung von	% gelöst
10 Tg.	10 %ige Essigsäure	13,6
10 Tg.	10 %ige Essigsäure + 0,02 m NaJO_4	100,0

Von der gleichzeitigen Einwirkung von Harnstoff-Essigsäure und Perjodat und Perjodat in Lösung gegangenen Kollagen ist nur ein kleiner Teil (9,3 %) dialysierbar. Die Hauptmenge verbleibt nach Entfernung von Harnstoff als gelatineartige Masse im Dialyserschlauch.

Die Aminosäuren dieser Gelatine unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung etwas mehr von der des Ausgangskollagens (Tabelle 6), doch sind keine grundsätzlichen Abweichungen zu erkennen, wenn man wieder von Methionin, Tyrosin und Hydroxylysin absieht, die in ihren Seitenketten oxydiert werden. Die meisten Aminosäuren wurden etwas niedriger gefunden. Prolin und Hydroxyprolin sind dagegen erhöht. Offenbar verursachen die 9,3 % dialysierbaren Materials nach der Perjodatoxydation diese Veränderungen. Der Hexosengehalt des aufgelösten Kollagens (0,11 Gew.%) nach Dialyse unterscheidet sich nicht vom ungelösten Kollagen nach Perjodatbehandlung (0,13 %).

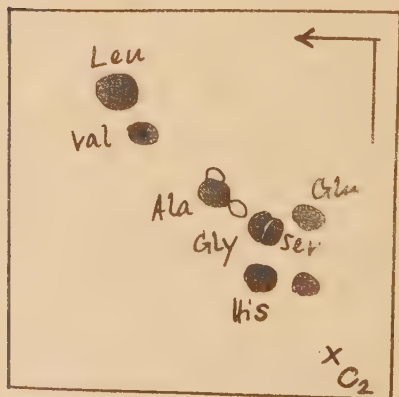
3.) Der Perjodatabbau von Kollagen bei erhöhter Temperatur

Bereits 1955 fanden Graßmann und Kühn (17), daß man Kollagen bei 40°C durch Einwirkung von Perjodat in bikarbonatalkalischem Medium (pH 8,0) bis auf einen geringen Rest in Lösung bringen kann, also bei Bedingungen, unter denen lösliches Kollagen denaturiert wird. Eigene Untersuchungen zeigen, daß der verbleibende Abbaurückstand (0,43 Gew.%) nicht mehr alle Aminosäuren des Kollagens enthält, wie das Papierchromatogramm in Abbildung 24 zeigt. Es fehlen

vor allem Hydroxyprolin, Arginin und Lysin. Dafür scheinen Leucin, Valin, Alanin und Glutaminsäure stark vertreten. Es liegt die Annahme nahe, daß es sich bei diesem Rückstand um Elastin handelt, mit dem das Ausgangsmaterial etwas verunreinigt war. Dieser Rückstand läßt sich aber zum Teil (41,6 %, bezogen auf den Rückstand) mit einem für Lipide charakteristischen Lösungsmittelgemisch (Chloroform-Methanol 3:1) extrahieren.

Die bei der Perjodateinwirkung auf Kollagen bei 40°C erhaltene Abbaulösung wurde chemisch nicht weiter untersucht. Es wurde lediglich festgestellt, daß es sich hierbei um ein Abbauprodukt handelt, das noch in geringer Konzentration (1,7 %) geliert und eine Viskosität von etwa 50-60 mPoise (bezogen auf 10 %ige Standardgelatinelösungen bei 60°C) besitzt. Dieser Wert entspricht einer handelsüblichen Gelatine mittlerer Viskosität.

Abbildung 24: Papierchromatographische Trennung eines Kollagenrückstands, der nach Perjodatoxydation von Kollagen bei 40°C erhalten wurde, nach Hydrolyse



aufgetragen:

C₂ = 0,840 mg Kollagenrückstand

Lösungsmittel: Phenol/Cresol 1:1
und Butanol/Eisessig/W 4:1:5

Sprühreagens: Ninhydrin

V. Der Hydroxylaminabbau von Prokollagen und Kollagen

Die Versuche über die Einwirkung von Perjodsäure auf Kollagen haben gezeigt, daß Kollagen bei Zerstörung seines Zuckeranteils

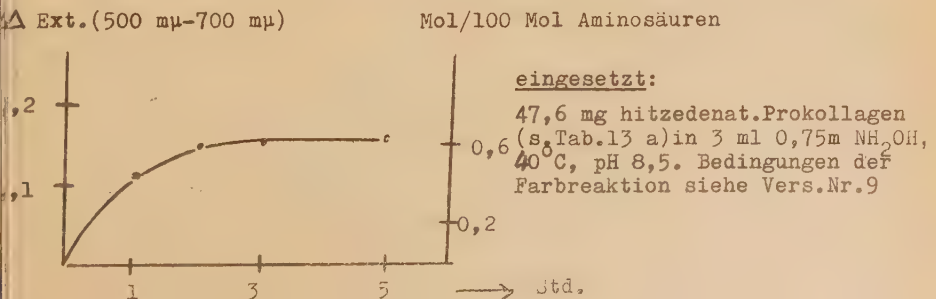
les in Lösung gebracht werden kann. Das macht wahrscheinlich, daß die Kohlenhydrate Bindeglieder zwischen Eiweißbausteinen darstellen und wirft die Frage auf, wie die Kohlenhydrate an das Eiweiß gebunden sind. Wenn Kohlenhydrate als Bindeglieder wirksam sein sollen, müssen sie selbstverständlich zumindest bivalent gebunden sein, was nur möglich ist, wenn neben der glykosidischen Bindung noch eine weitere Bindung vorliegt. Dabei ist vor allem die Möglichkeit einer esterartigen Bindung an das Eiweiß in Betracht zu ziehen.

Im vorliegenden Abschnitt soll über Versuche berichtet werden, mit Hilfe der Hydroxylaminreaktion Auskunft über das Vorhandensein von Estergruppierungen in Kollagen und ihre Bedeutung zu erlangen.

1.) Verhalten von Prokollagen gegen Hydroxylamin

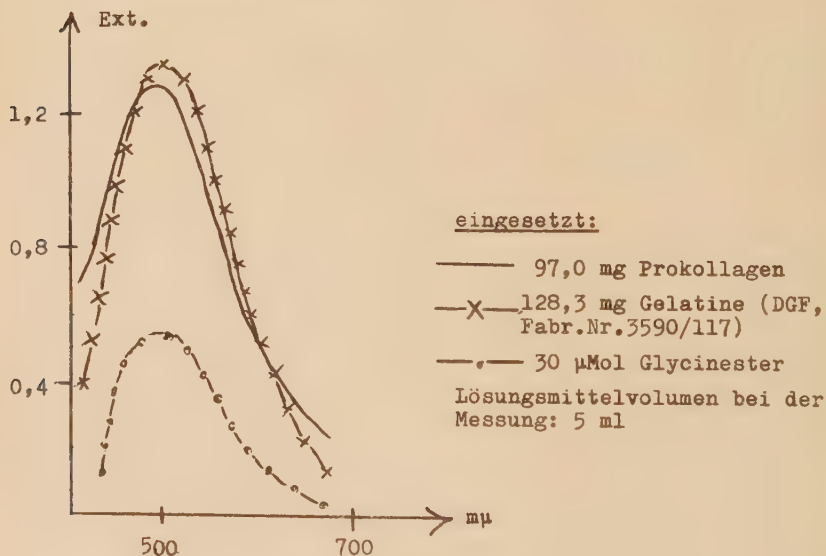
Prokollagen, welches durch Erwärmen auf 40°C in Wasser oder bei Zimmertemperatur in 4 m LiCl gelöst worden war, wobei es in beiden Fällen denaturiert wird, reagiert, wie bereits Gallop (22) gefunden hatte, mit Hydroxylamin unter Bildung von Hydroxamsäuren. Eine Nacharbeitung dieser Versuche ist in Abb.25 wiedergegeben. Man erkennt, daß die Reaktion bei pH 8,5 innerhalb von etwa 1 Stunde einen Endwert erreicht und dann nicht oder nur mehr sehr langsam weiter fortschreitet. Dieses Verhalten entspricht durchaus einer Spaltung von Esterbindungen mit Hydroxylamin (vergl.S.24). Peptidbindungen würden zur Hydroxamsäurebildung wesentlich längere Reaktionszeiten erfordern.

Abbildung 25: Umsetzung von Prokollagen mit Hydroxylamin



Das Absorptionsspektrum des Fe-Hydroxamsäurekomplexes ist in Abbildung 26 wiedergegeben. Das Maximum stimmt mit dem bei der Umsetzung von Glycinester, Hippursäureester und Gelatine erhaltenen gut überein.

Abbildung 26: Absorptionsspektren von Fe-Hydroxamiden aus Hydroxamsäuren, dargestellt durch Umsetzung von Prokollagen, Gelatine und Glycinester mit Hydroxylamin (Reaktionsbedingungen siehe Vers.Nr.9)



Die Mengen an Hydroxamsäuren, welche man beim Umsatz verschiedener Prokollagenpräparate erhält, ist sehr verschieden und hängt, wie man aus Tabelle 12 entnehmen kann, vom Alter des Präparates ab. In frisch umdialysierten Proben sind die Werte am niedrigsten, bei länger gelagerten findet man dagegen höhere Werte. Werden die Proben dagegen nach der Umsetzung mit Hydroxylamin dialysiert, so findet man im nicht dialysierbaren Anteil stets wieder etwa ebensoviel Hydroxamsäuren, wie in den frisch dialysierten Proben. Offenbar

gehen beim Lagern niedrigmolekulare Karbonsäuren (Zitronensäure aus dem bei der Herstellung verwendeten Puffer, die bei der Abscheidung der Fasern durch Dialyse nicht restlos entfernt werden konnte) Esterbindungen mit Hydroxylgruppen des Eiweißkörpers ein.

In einem weiteren Versuch wurde "gealtertes" Prokollagen in Zitratpuffer suspendiert und der lösliche Anteil zweimal nach Sevag (25) von Begleithohlenhydraten befreit und anschließend einmal durch Dialyse "umkristallisiert". Das derart gereinigte Prokollagen enthielt wenig Ester mehr als frisch hergestelltes.

Tabelle 13: Hydroxamsäurereaktion von Prokollagen, welches verschiedenen lange gelagert worden war

	gefunden Mol Hydrox.säure(x)/100 Mol Aminosäuren		
	Bedingungen	vor	nach Dialyse
frisch umdialysiert a)	40°C	0,64	0,65
5 Wochen alt	20°C, 4 m LiCl	1,45	0,66
3 1/2 Monate alt	20°C, 4 m LiCl	2,00	0,62
3 1/2 Monate alt und nach Sevag gereinigt	20°C, 4 m LiCl	0,84	0,65

(x) bezogen auf Hippursäureäthylester

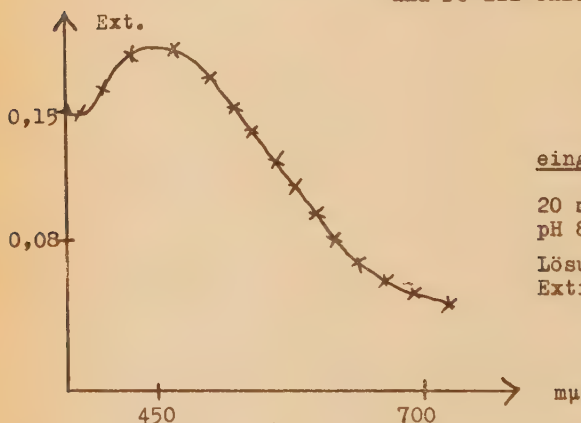
Natives Prokollagen löst sich in 0,75 m Hydroxylaminlösung (pH 8,5) bei Zimmertemperatur innerhalb von 14 Stunden auf. die Lösung ist sehr viskos. Beim Versetzen mit Fe^{+++} bildet sich ein Farbkomplex mit einem Maximum bei 450 m μ , das also etwas verschoben gegenüber der Fe^{+++} - Reaktion einfacher Hydroxamsäuren ist, welche ein Absorptionsmaximum bei 500 m μ aufweisen. Offenbar ist das Fe-Hydroxamsäurespektrum am nativen Eiweißkörper etwas verschoben, wie dies auch in ähnlich gelagerten Fällen oft beobachtet wurde. Die quantitative Auswertung der Hydroxamsäuren, die hier nur mit größerer Fehlerbreite möglich ist, ergab einen Wert von etwa 1,0 Mol Hydroxamsäuren/100 Mol Aminosäuren. Dialysiert man die viskose Probelösung

nach dem Umsatz mit Hydroxylamin, so scheidet sich das Eiweiß in Form von Fäserchen ab.

Tabelle 14: Auflösung von nativem Prokollagen durch Hydroxylamin
(20 mg Prokollagen, 3 ml, pH 8,5. 20°C)

Dauer	Einwirkung von	% gelöst
14 Std.	-	19,5
14 Std.	0,75 m NH_2OH	100,0

Abbildung 27: Absorptionsspektrum vom Fe-Hydroxamidkomplex aus nativem Prokollagen nach Umsetzung mit Hydroxylamin und Fe-III-chlorid Zugabe



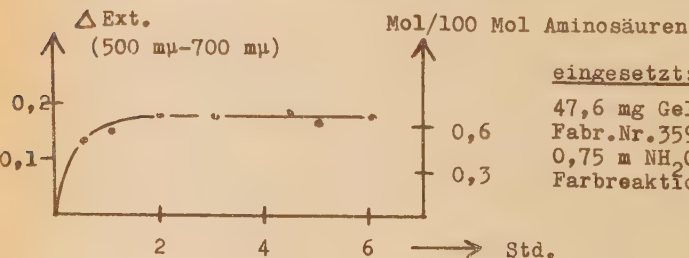
eingesetzt:

20 mg natives Prokollagen,
pH 8,5. 20°C

Lösungsmittelvolumen bei der
Extinktionsmessung: 5 ml

Ähnlich wie denaturiertes Prokollagen läßt sich auch handelsübliche Gelatine mit Hydroxylamin umsetzen (Abb.28,26). Die Menge der an einer alkalisch aufgearbeiteten Hautgelatine gefundenen Hydroxamsäuren betrug 0,76 Mol/100 Mol Aminosäuren, war also etwa gleich wie beim Prokollagen.

Abbildung 28: Umsetzung von Gelatine mit Hydroxylamin



eingesetzt:

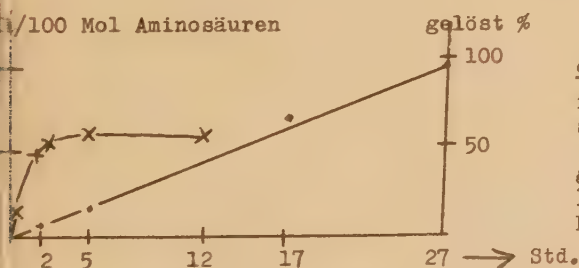
47,6 mg Gelatine (Firma DGF,
Fabr.Nr.3590/117) in 3 ml
0,75 m NH_2OH . Bedingungen der
Farbreaktion siehe Vers.Nr.9

2.) Verhalten von Kollagen gegen Hydroxylamin ohne Wasserstoffbrückenbindungen spaltende Agentien

Behandelt man Kollagen bei 40°C mit Hydroxylamin bei pH 8-9, so geht nach etwa 19 Stunden bis auf Spuren alles in Lösung. Führt man die Hydroxaminierung bei 37°C durch, so ist erst nach etwa 18 Stunden alles gelöst, bei Zimmertemperatur jedoch sind selbst nach 16 Tagen nur 25 % in Lösung gegangen. In diesen Lösungen lassen sich mit Fe^{+++} Hydroxamsäuren nachweisen. Ihre Menge beträgt 0,22 Mol/100 Mol Aminosäuren (Tab.23), entsprechend 120 $\mu\text{Mol/g}$ Kollagen. In Abbildung 29 ist die Auflösung von Kollagen und das Auftreten von Hydroxamsäuren in der überstehenden Lösung verfolgt.

Abbildung 29: Auflösen von Kollagen mit Hydroxylamin bei 37°C.

Abspaltung von Hydroxamsäuren



eingesetzt:

für die Extinktionsmessungen 23,8 mg Kollagen (s.Tab.23 I). Bedingungen des Umsatzes m. NH_2OH : 3 ml 0,75 m NH_2OH , 37°C pH 8-9. Farbreakt. Vers.9

— • — Löslichkeit (Gew.%) von Kollagen bei 37°C während der Umsetzung mit Hydroxylamin

— X — Extinktion des gelösten Anteiles nach Fe^{+++} Zugabe

Man erkennt, daß die Menge der Hydroxamsäuren nach etwa 2 Std. ihren Endwert erreicht, der nur etwa 1/3 der in Gegenwart von LiCl erzielten Menge (s.Abb.32) beträgt. Die Auflösung von Kollagen geht jedoch wesentlich langsamer vor sich und führt zu keiner weiteren Zunahme von Hydroxamsäuren. Es besteht also kein Zusammenhang zwischen der Abspaltung dieser Hydroxamsäuren und der Löslichkeit von Kollagen.

Der Hexosengehalt von hydroxylaminbehandeltem Kollagen ist mit 0,44 % gegenüber dem Ausgangsmaterial, in dem 0,45 % Hexosen gefunden worden waren, nicht verändert. Auch die Aminosäurezusammensetzung unterscheidet sich nicht vom Ausgangsmaterial (Tab.15).

Tabelle 15: Aminosäurezusammensetzung des gelösten und ungelösten Anteiles von Kollagen, das in Abwesenheit von H-Sprengern mit Hydroxylamin umgesetzt worden war. (Kollagen 3 Std. bei 37°C mit 0,75 m NH_2OH inkubiert (pH 8,5))

Aminosäure	Mol Aminosäure pro 100 Mol Aminosäuren		
	Kollagen	Rückstand	gelöst. Anteil
Asp	5,23	4,75	5,26
Glu	7,33	7,44	7,67
Gly	32,82	33,30	32,70
Ala	11,61	10,83	9,81
Ser	2,40	3,48	3,77
Thr	1,72	1,50	1,65
Tyr	0,38	0,40	0,17
Val	2,02	2,03	2,13
Met	0,40	0,38	-
I. Leu	1,29	1,25	1,54
Leu	2,54	2,24	2,37
Phe	1,38	1,29	1,31
Pro	15,91	14,18	13,08
OH-Pro	6,28	8,30	8,65
His	0,68	0,52	0,52
Lys	2,44	2,64	3,15
OH-Lys	0,16	0,66	1,42
Arg	5,14	4,80	4,80
Summe	100,00	100,00	100,00

Der Schrumpfungspunkt des mit NH_2OH behandelten noch ungelösten Kollagens ist nach Abspaltung der oben genannten Hydroxamsäuren gegenüber unbehandeltem Kollagen praktisch nicht erniedrigt (Tabelle 16). Dieses Ergebnis spricht dafür, daß die abgespalte-

nen Hydroxamsäuren für die Struktur des Kollagens nicht von Bedeutung sind.

Tabelle 16: Gegenüberstellung des Schrumpfungspunktes v. Kollagen und hydroxylaminbehandeltem Kollagen

	Kollagen	NH ₂ OH behandeltes Kollagen (3 Std. bei 37°C)
T _g	63	61
	62	61
	63	60
Mittelwert	62,5	61,3

Reaktionsbedingungen: Umsetzung von Kollagen mit 0,75 m NH₂OH.
3 Std. bei 37°C. pH 8,5

Diese abgespaltenen Hydroxamsäuren sind nur zu einem kleinen Anteil dialysierbar, wie man aus Tabelle 17 entnehmen kann. Es lag daher die Vermutung nahe, daß es sich um Mucopolysaccharide handeln könnte, die mit Kollagen verestert waren.

Um diese Annahme experimentell zu belegen, wurde die nach 2 Stunden gelöste Komponente durch Dialyse und Gefriertrocknung isoliert und analysiert. Ihre Menge betrug 5,8 Gew.% des eingesetzten Kollagens.

Tabelle 17: Hydroxamsäure- und Zuckergehalt des Kollagenanteiles, der nach 2 Std. durch Hydroxylamin aufgelöst wurde

Hydroxamsäuren		Zucker		
	Mol/100 g		Mol/100 g	%
vor } nach } Dialyse	0,204	Uronsäure	0,0035	0,69
	0,138	Hexosamin	0,0045	0,80

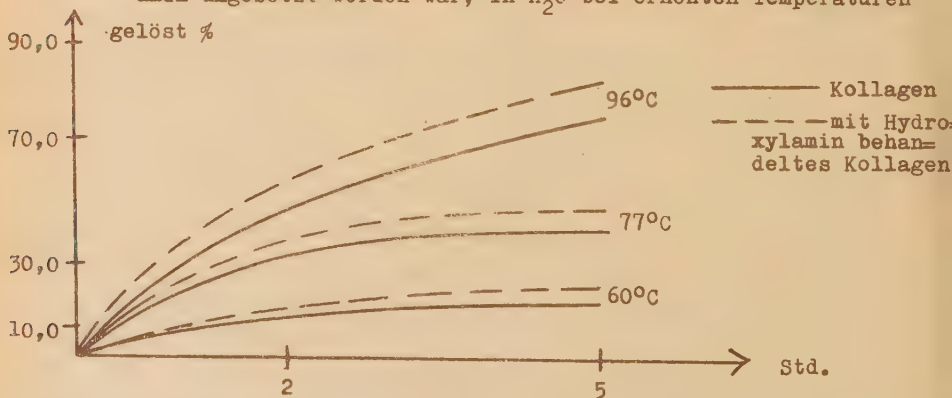
Tatsächlich wurden in dieser Fraktion Uronsäuren und Hexosamine etwa in molekularem Verhältnis 1:1 nachgewiesen. Die absoluten Anteile an Uronsäure und Hexosamine in dieser Fraktion stellen jedoch keine hohen Werte dar, doch bedeuten sie immerhin eine Anreicherung gegenüber dem Kollagen. Die Menge an Hydroxamsäuren in dieser Fraktion (0,138 Mol/100 g) ist jedoch erheblich größer als die Mengen der Uronsäuren (0,0035 Mol/100 g) und Hexosamine (0,0045 Mol pro 100 g), sodaß die Hauptmenge der Hydroxamsäuren anderen Verbindungen

dungen entstammen muß. Die Aminosäurezusammensetzung des gelösten Materials (Tab.15) unterscheidet sich praktisch nicht von der des Ausgangskollagens. Die Natur der abgespaltenen Hydroxamsäuren ist noch nicht geklärt.

Löslichkeit von hydroxylaminbehandeltem Kollagen in Wasser bei erhöhten Temperaturen

Wie man aus Abb.30 ersieht, ist die Löslichkeit von Kollagen, welches 3 Std. bei 37°C mit Hydroxylamin in Abwesenheit von Wasserstoffbrückenbindungen spaltenden Agentien vorbehandelt worden war, in Wasser bei 60°C und 77°C nur unwesentlich von der der unbehandelten Probe verschieden. Bei 96°C ist dagegen eine etwas stärkere Auflösung zu beobachten. Dieses Ergebnis spricht ebenfalls dafür, daß die bei der Hydroxylaminbehandlung ohne H-Sprenger abgespaltenen Hydroxamsäuren für die Struktur des Kollagens ohne besondere Bedeutung sind. Die etwas größere Löslichkeit bei 96°C kann zwanglos damit erklärt werden, daß die Faser bei der Vorbehandlung mit Hydroxylamin eine geringe Schädigung erleidet.

Abbildung 30: Löslichkeit von Kollagen, das in Abwesenheit von Wasserstoffbrückenbindungen spaltenden Agentien mit Hydroxylamin umgesetzt worden war, in H₂O bei erhöhten Temperaturen



Reaktionsbedingungen: Kollagen 3 Std. mit 0,75 m NH₂OH bei 37°C. pH 8,5
 Löslichkeitsbedingungen: 20 mg Proben in 5 ml Wasser

3.) Das Verhalten von Kollagen gegen Hydroxylamin in Gegenwart von
Wasserstoffbrückenbindungen spaltenden Agentien

Versucht man Kollagen, welches mit Hydroxylamin vorbehandelt worden war, in Wasserstoffbrückenbindungen spaltenden Agentien (4m LiCl) zu lösen, so gehen innerhalb von 8 Tagen nur etwa 28 % in Lösung.

Tabelle 18: Nacheinanderfolgende Einwirkung von Hydroxylamin und LiCl auf Kollagen (20 mg Kollagen, 4 m LiCl. 0,75m NH_2OH pH 8,5. 20°C, 3 ml)

Dauer	Einwirkung von	% gelöst
1. 8 Tage	0,75 m NH_2OH	12,0
2. 8 Tage	4 m LiCl	28,3

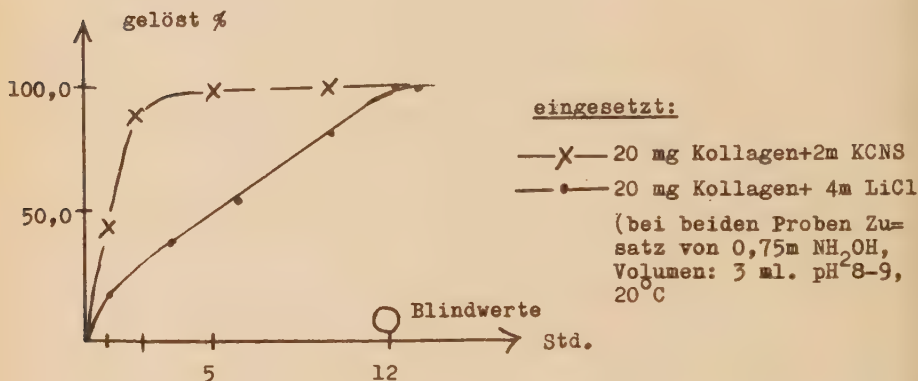
Setzt man dagegen bei der Einwirkung von Hydroxylamin auf Kollagen Wasserstoffbrückenbindungen sprengende Agentien zu, so geht Kollagen in kurzer Zeit bei Zimmertemperatur vollkommen in Lösung. Einige Beispiele sind in Tab.19 zusammengestellt. In Spalte 1 dieser Tabelle sind die Zeiten angegeben, die zur vollständigen Auflösung von Kollagen notwendig sind.

Tabelle 19: Löslichkeit von Kollagen während der Hydroxaminierung in Gegenwart Wasserstoffbrückenbindungen spaltender Agentien (20 mg Kollagen, 3 ml, pH 8-9, 20°C)

Dauer	Einwirkung von	% gelöst
12 Std.	2 m KCNS	2,9
5 Std.	2 m KCNS + 0,75 m NH_2OH	100,0
10-13 Std.	5,5 m LiBr	4,5
	5,5 m LiBr + 0,75 m NH_2OH	100,0
10-13 Std.	4 m LiCl	3,6
	4 m LiCl + 0,75 m NH_2OH	100,0

Der zeitliche Verlauf der Auflösung ist in Abbildung 31 wiedergegeben.

Abbildung 31: Löslichkeit von Kollagen in Gegenwart von Hydroxylamin und Wasserstoffbrückenbindungen spaltenden Agentien



Aus Tabelle 20 kann man die pH-Abhängigkeit der Reaktion entnehmen. Die Auflösung von Kollagen durch Hydroxylamin in Gegenwart von LiCl beginnt etwa bei Ph 7 und wird unter den angegebenen Bedingungen bei pH 8,0 vollständig.

Tabelle 20: Auflösung von Kollagen durch Hydroxylamin/LiCl in Abhängigkeit vom pH (20 mg Kollagen, 3 ml, 4 m LiCl, 0,75 m NH_2OH , 20°C, 21 Std.)

pH	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5
% gelöst	6,6	16,4	40,9	100,0	100,0

Dialysiert man die erhaltenen Lösungen gegen Wasser, so erhält man eine gelatineartige Eiweißlösung. Der dialysierbare Anteil an Kollagenstickstoff nach der Umsetzung mit Hydroxylamin/LiCl wurde zu 15 % bestimmt.

Hitzenedenuriertes Kollagen wird bei Zimmertemperatur von 0,75 m NH_2OH auch ohne Zusatz von LiCl oder ähnlichen Agentien vollständig aufgelöst.

Tabelle 21: Auflösung von hitzedenaturiertem Kollagen durch Hydroxylamin (20 mg Kollagen, 3 ml, pH 8-9. 20°C. Denaturierung: 10 Min. bei 70°C)

Dauer	Einwirkung von	% gelöst
3 Tg.	-	21,5
1 Tg.	0,75 m NH_2OH	100,0

Dagegen geht Kollagen, welches mit 4 m LiCl vorbehandelt und ausgewaschen worden war, unter der Einwirkung von Hydroxylamin allein nur sehr langsam in Lösung.

Tabelle 22: Einwirkung von NH_2OH auf LiCl-behandeltes Kollagen

Dauer	Einwirkung von	% gelöst
1. 14 Tage	4 m LiCl	14,3
2. 8 Tage	0,75 m NH_2OH	44,2
(x) 8 Tage	0,75 m NH_2OH	12,0

(x) unbehandeltes Kollagen

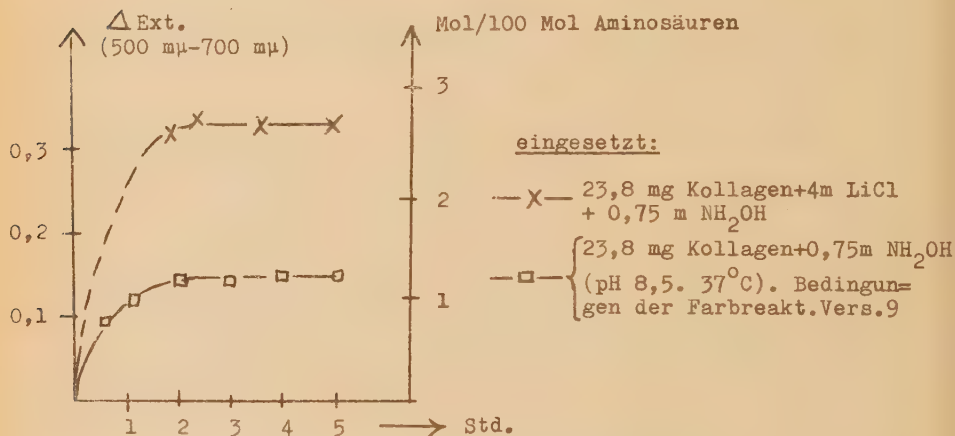
Das vollkommen neuartige Verhalten von Kollagen bei gleichzeitiger Einwirkung von Hydroxylamin und Wasserstoffbrückenbindungen spaltenden Agentien ließ es wünschenswert erscheinen, festzustellen, ob bei der Einwirkung von Hydroxylamin in Gegenwart dieser Agentien die gleiche oder eine größere Anzahl von Hydroxamsäuren gebildet wird wie in Abwesenheit.

Die Bestimmung der Hydroxamsäuren kann nicht in Gegenwart jedes Wasserstoffbrückenbindungen spaltenden Mittels erfolgen. Von vorneherein scheiden KCNS, LiJ und LiBr aus. Für die Überführung der gebildeten Hydroxamsäuren in den Farbkomplex ist die Zugabe von Fe^{+++} erforderlich. Rhodanidjone bilden mit Fe^{+++} ein blutrotes Eisensalz, auch LiBr und LiJ stören, da diese Halogenanionen durch Fe^{+++} oxydiert werden und die Lösungen färben würden. Als geeignet erwies sich p-Toluolsulfosaures-Na (94), das jedoch in der notwendigen hohen Konzentration experimentell schwierig zu hand-

haben waren. Am Günstigsten zeigte sich eine 4 molare LiCl-Lösung.

Die Ergebnisse der Hydroxamsäurebestimmung mit und ohne Anwesenheit von Wasserstoffbrückenbindungen spaltenden Agentien sind in Abbildung 32 zusammengestellt.

Abbildung 32: Hydroxamsäurebestimmung von Kollagen in Gegenwart und Abwesenheit von LiCl



Man erkennt, daß bei der Behandlung von Kollagen mit Hydroxylamin unter Zusatz von LiCl erheblich mehr Hydroxamsäure in Lösung gehen als in Abwesenheit von LiCl. Gleichzeitig geht das gesamte Kollagen in Lösung. Die Menge der Hydroxamsäuren bleibt mit der vollständigen Auflösung des Kollagens konstant.

Die bei der gleichzeitigen Einwirkung von Hydroxylamin und LiCl zusätzlich gebildeten Hydroxamsäuren scheinen also für die Struktur des Kollagens von entscheidender Bedeutung zu sein.

Will man den Versuch unternehmen, einen stöchiometrischen Zusammenhang zwischen der Menge der Hexosen und der Hydroxamsäuren des Kollagens aufzustellen, um die Kohlenhydrate als Brückenglieder zwischen Eiweißbestandteilen zu identifizieren, so scheint es richtig, nur diejenigen Hydroxamsäuren (1,07 Mol/100 Mol Aminosäuren) mit den Hexosen zu vergleichen, die in Gegenwart von LiCl zusätzlich

gebildet werden. In Abwesenheit von LiCl gehen bei der Hydroxylaminbehandlung zwar Hydroxamsäuren in Lösung, doch bleibt der Hexosengehalt des ungelösten Kollagens unverändert.

Die mit Hydroxylamin und LiCl in Freiheit gesetzten Hydroxamsäuren sind zum größten Teil nicht dialysierbar. Der nicht dialysierbare Anteil enthält außerdem noch diejenigen Hydroxamsäuren, die ohne Zusatz von LiCl bzw. LiBr mit Hilfe des Hydroxylamins von Kollagen abgespalten werden und die auf Seite 55 für die Auflösung des Kollagens als nicht entscheidend angesprochen worden sind. Nach Abzug dieses Anteiles hinterbleibt ein Rest von etwa 1,09 bzw. 1,06 Mol Hydroxamsäure pro 100 Mol Aminosäuren, der offenbar direkt an das Kollagen gebunden ist und dessen Entstehung für die Auflösung des Kollagens entscheidend ist. Die angeführten Berechnungen sind in Tabelle 23 zusammengestellt.

Tabelle 23: Bildung von Hydroxamsäuren bei der Auflösung von Kollagen durch Hydroxylamin

Vers.Nr.	Eingesetztes Reagens	Hydroxamsäuren i. Lösung Mol/100 Mol Aminosäuren	
		vor Dialyse	nach (2 Tg.)
I (s. Abb. 32)	0,75 m NH_2OH	1,22	0,83
II (s. Abb. 32)	0,75 m NH_2OH + 4 m LiCl	2,78	1,92
II - I		<u>1,56</u>	<u>1,09</u>
III	0,75 m NH_2OH + 5,5 m LiBr		1,89
III - I			<u>1,06</u>

Schließlich haben wir noch die Hydroxamsäurebestimmung an den trypsinresistenten Produkten untersucht, welche beim tryptischen Abbau von denaturiertem Kollagen hinterbleiben (s. Seite 29) und in welchen die Hexosen angereichert sind. Untersucht wurde ein Rückstand mit einem Hexosengehalt von 8,5 Gew.%. Bei der Behandlung mit 0,75 m NH_2OH und 4 m LiCl ging dieser Rückstand zu 63 % in Lösung.

Der ungelöste Rest besteht aus nicht kollagenem Material wie Haare, Lipide und anorganische Verunreinigungen, die sich bei der Darstellung dieses Kollagenrückstandes ebenfalls angereichert hatten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 24 zusammengestellt.

Tabelle 24: Anreicherung von Hexosen und Hydroxamsäuren in einem Rückstand, der durch tryptischen Abbau von denaturiertem Kollagen erhalten worden war

	Ausgangskollagen		Kollagenrückstand	
			Gesamtrückstand	lösli. Anteil
Hexosen ($\mu\text{Mol/g}$)	36 (a)		475 (b)	750 (b)
Hydroxamsäuren ($\mu\text{Mol/g}$)	102 (c)		1020	1620*
Hydroxamsäuren:Hexosen	2,83		2,16	

(a) berechnet als Glucose+Galaktose 1:1 (s.Abb.16)

(b) berechnet als Glucose (s.Abb.17)

(c) berechnet als Hydroxamsäuren = 1,07 Mol/100 Mol Aminosäuren (s.Tab.23)

Man erkennt, daß in dem nach Trypsinabbau erhaltenen Kollagenrückstand sowohl die Hexosen des Kollagens als auch die Hydroxamsäuren angereichert sind. Wählt man für den Vergleich diejenige Menge an Hydroxamsäuren des Kollagens, welche nur in Gegenwart von LiCl in Freiheit gesetzt wird (1,07 Mol/100 Mol Aminosäuren) (x), dann ergibt sich für das Verhältnis von Hydroxamsäuren : Hexosen in Kollagen und im Kohlenhydratanreicherungsprodukt ein ähnlicher Wert. Die Hexosen sind im Rückstand etwa 14 fach, die Hydroxamsäuren etwa 10 fach gegenüber dem Ausgangskollagen angereichert. Das ist ein starkes Argu-

(x) Anmerkung: Es erscheint gerechtfertigt, im nativen Kollagen nur diejenigen Hydroxamsäuren (1,07 Mol/100 Mol Aminosäuren) in Beziehung zu den Hexosen zu setzen, die bei der Hydroxaminierung in Gegenwart von LiCl zusätzlich gebildet werden, da der Hexosenanteil des noch nicht gelösten Kollagens nach Hydroxylaminbehandlung in Abwesenheit von LiCl unverändert gefunden wurde (vergl. Seite 56).

ment dafür, daß es sich bei den hydroxylaminempfindlichen Bindungen des Kollagens um Estergruppen handelt, an denen Hydroxylgruppen der Kohlenhydrate beteiligt sind (vergl. Diskussion S. 84).

4.) Verhalten von Kollagen gegenüber verschiedener N-Basen

Nachdem im vorhergehenden Abschnitt gezeigt worden war, daß Kollagen von Hydroxylamin in Gegenwart Wasserstoffbrückenbindungen spaltender Agentien bei schwach alkalischem pH bei Zimmertemperatur aufgelöst werden kann, erschien es wünschenswert, auch die Wirkung anderer basischer Verbindungen (N-Basen und Kalkmilch) zu untersuchen.

Um festzustellen, ob das Inlöslichwerden von Kollagen auf die Basennatur des Hydroxylamins zurückzuführen ist, wurden auch Löslichkeitsversuche mit Tributylamin unternommen. Aus Tabelle 25 kann man ersehen, daß keine Lösung erfolgt.

Tabelle 25: Löslichkeit von Kollagen in Basen in Gegenwart von Wasserstoffbrückenbindungen spaltenden Agentien
(20 mg Kollagen, 3 ml, pH 8-9, 20 °C)

Dauer	Einwirkung von	% gelöst
12 Std.	2 m KCNS	2,9
12 Std.	1 m Tributylamin + 2 m KCNS	4,3
12 Std.	0,75 m NH_2OH + 2 m KCNS	100,0

Nach Befunden von Gallop (22) kann für eine Esterspaltung nicht nur Hydroxylamin, sondern auch Hydrazin herangezogen werden. Wie meine Ergebnisse zeigen, ist es auch nach längerer Einwirkung nicht gelungen, Kollagen selbst in Gegenwart Wasserstoffbrückenbindungen spaltender Agentien in Lösung zu bringen (Tabelle 27 und Abbildung 34). Erhöht man die Temperatur auf 40 °C, so ist zwar nach 35 Std. alles gelöst, doch ist dies wohl der alkalischen Reaktionslösung zuzuschreiben, da beim Blindversuch auch schon 85 % in Lösung gingen (tab. 27). Ein Versuch, den bei der Hydrazinidierung von Kollagen verbliebenen Rückstand durch Perjodat oxydation in Gegenwart

von Harnstoff in Lösung zu bringen, führte nur mehr zu einer teilweisen Auflösung (Tabelle 26).

Tabelle 26: Nacheinanderfolgende Einwirkung von Kollagen mit Hydrazin und Perjodat (20 mg Kollagen, 3 ml)

Dauer	Einwirkung von	% gelöst
1. 12 Tage	0,75 m Hydrazin + 2 m KCNS (pH 8,5)	0,0
2. 12 Tage	8 m Harnstoff + 10 %ige Essigsäure + 0,02 m NaJO ₄	45.0

Dieser Unterschied im Löslichkeitsverhalten im Vergleich zur Hydroxylaminreaktion läßt sich vielleicht so interpretieren, daß im Hydrazin zwei funktionelle Gruppen vorliegen, die mit zwei benachbarten Peptidketten reagieren können und so den Eiweißkörper nach primärer Esterspaltung wieder quervernetzen, wobei das Kollagen wieder unlöslich wird. Es kann auch durch Perjodat-Harnstoff nicht mehr vollständig aufgelöst werden.

Abbildung 33: Mögliche Quervernetzung der Peptidketten des Kollagens durch Hydrazin



Zur Stütze dieser Annahme wurde einweiterer Versuch mit Semicarbazid durchgeführt. Dieses einseitig substituierte Agens sollte dieser Sekundärreaktion, Ausbildung einer erneuten Quervernetzung nach primärer Esterspaltung, nicht befähigt sein. Die Ergebnisse in Tabelle 27 scheinen unsere Vermutungen zu bestätigen. Kollagen geht bei der Umsetzung mit Semicarbazid in Gegenwart von H-Sprengern im Vergleich zur Hydroxylaminreaktion zwar sehr viel langsamer in Lösung, doch findet deutlich eine Umsetzung statt, wie der Vergleich mit den Blindproben zeigt. Ähnlich wie Semicarbazid vermag auch Ammoniak Kollagen in Gegenwart von Wasserstoffbrückenbindungen spal-

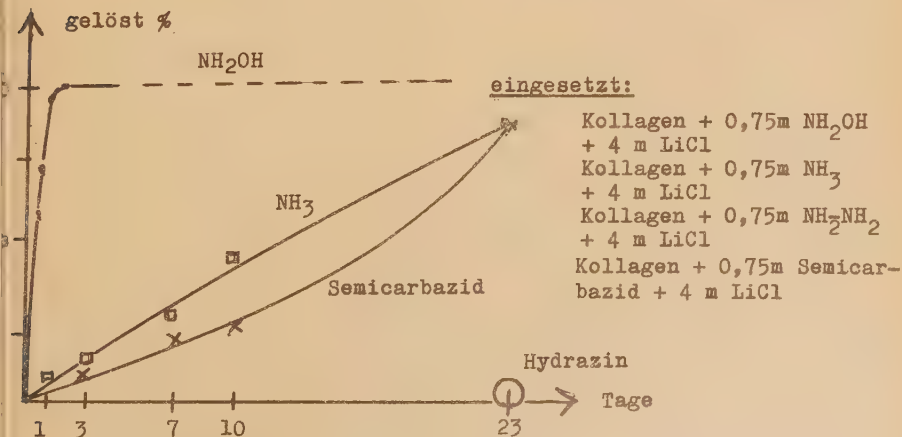
tenden Agentien langsam aufzulösen.

Tabelle 27: Löslichkeit von Kollagen bei der Umsetzung mit Hydrazin, Semicarbazid, Ammoniak in Gegenwart von LiCl
(20 mg Kollagen, 3 ml, pH 8-9)

Dauer	Temp.	Einwirkung von	% gelöst
24 Tg.	20°C	4 m LiCl	16,5
		0,75 m Hydrazin + 4 m LiCl	4,5
23 Tg.	20°C	0,75 m Semicarbazid	1,7
		0,75 m Semicarbazid + 4 m LiCl	87,0
23 Tg.	20°C	0,75 m NH ₃	2,9
		0,75 m NH ₃ + 4 m LiCl	86,5
35 Std.	40°C	4 m LiCl	85,0
		0,75 m Hydrazin + 4 m LiCl	100,0

Die Auflösung von Kollagen durch Semicarbazid und durch NH₃ ist bei 20°C in Gegenwart von 4 m LiCl in Abb.34 zeitlich verfolgt.

Abbildung 34: Löslichkeit von Kollagen bei der Umsetzung mit NH₃, Semicarbazid, Hydrazin und Hydroxylamin in Gegenwart von LiCl (20 mg Kollagen, 3 ml, 20°C, pH 8,5)



Positiv verlief auch der Versuch, Kollagen mit Kalkmilch in Gegenwart von LiCl bei Zimmertemperatur in Lösung zu bringen. Während beim Blindversuch ohne LiCl nur ein sehr geringer Anteil in Lösung ging, war bei den in Tabelle 28 erwähnten Bedingungen das gesamte Eiweiß in Lösung gegangen.

Tabelle 28: Löslichkeit von Kollagen in gesättigter Kalkmilch in Gegenwart Wasserstoffbrückenbindungen spaltender Agentien (20 mg Kollagen, 3 ml Kalkmilch, 20 °C, pH 11,5)

Dauer	Einwirkung von	% gelöst
6 Tage	gesättigte Kalkmilch	0,5
6 Tage	gesättigte Kalkmilch + 2 m KCNS	100,0
7 Tage	gesättigte Kalkmilch + 4 m LiCl	100,0

Man ersieht daraus, daß erst durch den Zusatz solcher Mittel die Verseifung bzw. Spaltung schwer zugänglicher Estergruppierungen erfolgen kann. Dieser Versuch wurde in einem größeren Ansatz wiederholt (siehe Exp. Teil Vers. Nr. 5.d). Nach Entfernung des Kalks und des Wasserstoffbrückenbindungen spaltenden Reagenses durch Dialyse wurde ein Abbauprodukt erhalten, das in Farbe, Klarheit und Erstarrungsvermögen der handelsüblichen Gelatine entspricht. Ähnliche Abbauprodukte wurden auch durch Einwirkung von Hydroxylamin auf Kollagen unter Zusatz von 4 m LiCl oder 2 m KCNS erhalten.

VI. Untersuchung der Perjodat- und Hydroxylaminabbauprodukte des Kollagens in Elektrophorese und Ultrazentrifuge

Vom Abbauprodukt des Kollagens mit Perjodat, erhalten durch Einwirkung bei 40°C, haben bereits Graßmann und Kühn (17) zeigen können, daß es bei pH 2,4 4,7 und 11,3 elektrophoretisch einheitlich ist.

1.) Elektrophoretische Prüfung des Hydroxylaminabbauproduktes von Kollagen

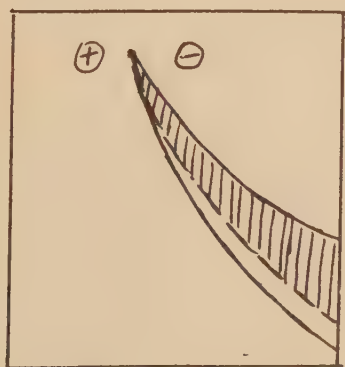
Gallop et al. (22) hatten gezeigt, daß die bei der Einwirkung von Hydroxylamin auf Prokollagen bzw. Gelatine erhaltenen Abbauprodukte

dukte ein Mol-Gewicht von etwa 20 000 besitzen. Das bedeutet, daß diese Bruchstücke wesentlich kleiner als Tropokollagen (Molekulargewicht 300 000) und auch als Gelatine aus Tropokollagen sein müssen. Letztere sedimentiert in der Ultrazentrifuge in zwei Fraktionen, welchen Molekulargewichte von 120 000 und 240 000 zugeschrieben werden (97).

Es erhebt sich nun die Frage, ob die unter der Einwirkung von Hydroxylamin/LiCl auf Kollagen erhaltenen hochmolekularen Abbauprodukte einheitlich sind oder ob es sich um ein Gemisch handelt. Gallop (22) berichtet, daß es ihm gelungen sei, mit Hydroxylamin behandelte Prokollagengelatine elektrophoretisch bei pH 4,0 in zwei hydroxamsäurepositive Fraktionen zu zerlegen.

Es ist daher versucht worden, ein aus Kollagen mit $\text{NH}_2\text{OH}/\text{LiCl}$ erhaltenen Lösungsprodukt in der vertikalen Elektrophoreseanordnung von Graßmann und Hannig aufzutrennen.

Abbildung 35: Elektrophoretische Prüfung des Hydroxylaminabbauproduktes von Kollagen auf Einheitlichkeit



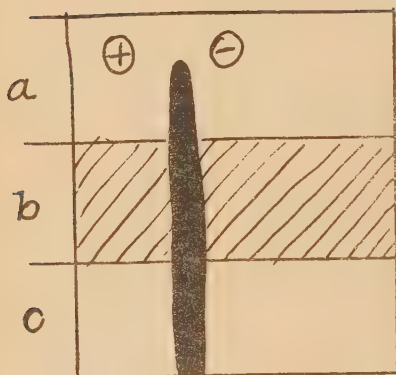
pH 2,5

Puffer: 0,5 n Essigsäure

780 V, 11 mA

Anfärbung: Amidoschwarz 10 B

Reaktionsbedingung: 20 mg Kollagen in 3 ml 4 m LiCl+0,75m NH_2OH
Lösung gegen H_2O dialysiert, mit Essigsäure pH 2,5 eingestellt



pH 4,9

Puffer: Pyridin/Essigsäure

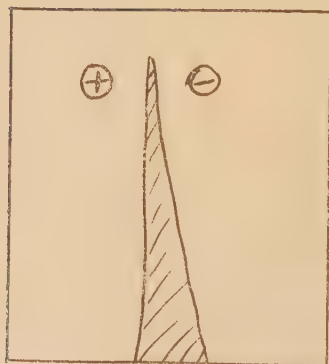
380 V, 20 mA

Anfärbung: a) Fe-III-chlorid

b) Amidoschwarz 10 B

c) Ninhydrin

Reaktionsbedingung: 20 mg Kollagen in 3 ml 2m KCNS+0,75m NH_2OH Lösung gegen H_2O dialysiert, mit Essigsäure pH 4,9 eingestellt



pH 8,6

Puffer: Veronal/Veronal.Na

700 V, 26 mA

Anfärbung: Amidoschwarz 10 B

Reaktionsbedingung: 20 mg Kollagen in 3 ml 4 m LiCl+0,75m NH_2OH Lösung gegen H_2O dialysiert, mit NaOH pH 8,6 eingestellt

Aus den Pherogrammen ist zu entnehmen, daß sich das Hydroxylaminabbauprodukt des Kollagens bei pH 4,9 einheitlich neutral verhält. Bei den pH-Werten 2,5 und 8,6 konnte zwar keine exakte Trennung erreicht werden, doch läßt sich aussagen, daß es sich nicht um einheitliche Abbauprodukte handelt, da die Fraktionen zu weit auseinandergezogen sind.

2.) Untersuchung des Perjodatabbauproduktes von Kollagen in der Ultrazentrifuge

Das bei der Einwirkung von Perjodat auf Kollagen in Gegenwart von Harnstoff gelöste Material ist hochmolekular und nur zu einem geringen Teil dialysierbar. Es sollte nun der Versuch unternommen werden, das erhaltene Lösungsprodukt in der Ultrazentrifuge zu charakterisieren. Die Sedimentationsbilder sind in der Abbildung 36 wiedergegeben, die Berechnungen finden sich im experimentellen Teil, siehe Versuch Nr. 11.

Man erkennt, daß das Perjodatabbauprodukt von Kollagen (Abb.36) als scharfe Bande sedimentiert. Die Sedimentationsgeschwindigkeit ist jedoch außerordentlich gering. Es errechnete sich eine Sedimentationskonstante

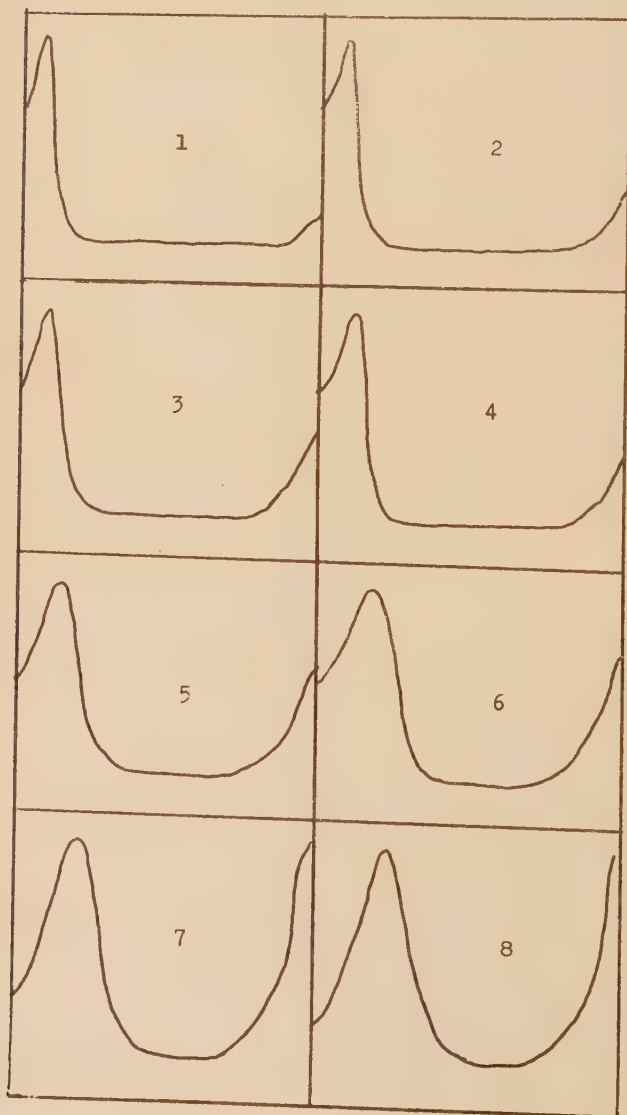
$$\underline{\underline{S_{20} = 0,66}} \quad [S]$$

Der Sedimentationsversuch hat keinen Anhaltspunkt dafür ergeben, daß mehrere Komponenten vorliegen, die sich in ihrem Verhalten unterscheiden.

Abbildung 36: Sedimentation des Perjodatabbauproduktes von Kollagen
(9,5 mg Kollagen in 1 ml 8m Harnstoff + 10 %ige Essig-
säure + 0,02m NaJO_4 gelöst. pH 2,5. Rotationsgeschwindigkeit:
51 000 U/min)

Abstand von t_0 in Minuten:

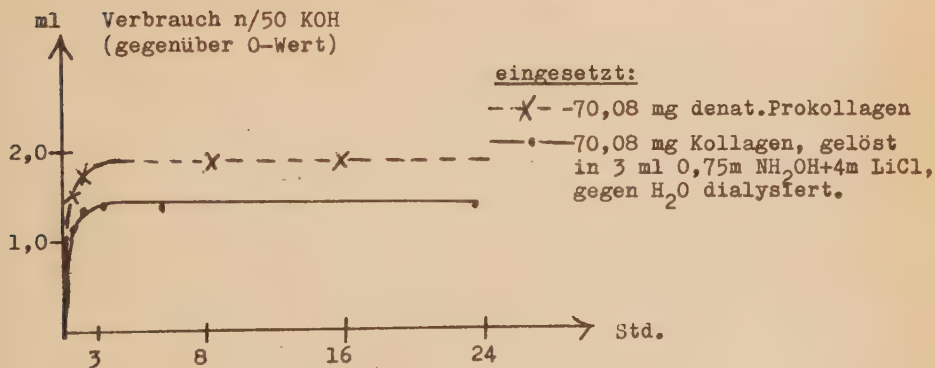
Bild	Min.
1	55
2	80
3	105
4	165
5	225
6	285
7	345
8	405



VII. Einwirkung von Trypsin auf das Hydroxylaminabbauprodukt des Kollagens

Läßt man Trypsin auf denaturiertes Kollagen einwirken, so geht der Eiweißkörper allmählich in Lösung. Dieser Abbau läßt sich analytisch durch den Zuwachs an Karboxylgruppen, der während der enzymatischen Spaltung von Peptidbindungen entsteht, verfolgen. Ich habe versucht, ob sich ein Hydroxylaminabbauprodukt des Kollagens bei der Trypsinbehandlung ähnlich verhält. Die bei der Trypsineinwirkung freiwerdenden Karboxylgruppen wurden mit Hilfe der Mikro-Titrationsmethode nach Graßmann und Heyde (50) bestimmt.

Abbildung 38: Alkalimetrische Verfolgung der Trypsineinwirkung auf das Hydroxylaminabbauprodukt des Kollagens (Vergleich mit dem Trypsinabbau von denaturiertem Prokollagen)



Der hierbei erhaltene Kurvenverlauf unterscheidet sich in der Form nicht von demjenigen, welcher durch den Alkaliverbrauch des mit Trypsin abgebauten hitzedenaturierten Prokollagens ermittelt wurde. Es zeigt sich beim Hydroxylaminabbauprodukt des Kollagens lediglich eine etwas geringere Zunahme der Karboxylgruppen. Die Auswertung der Ergebnisse ist in Tabelle 29 zusammengefaßt.

Tabelle 29: Auswertung der Ergebnisse aus Abbildung 38

(Einwaage: 70,08 mg Kollagen, entsprechend 0,692 Mol Aminosäuren)

Abbauzeit Std.	Verbrauch n/50 KOH	
	NH ₂ OH-Kollagen	Prokollagen
0	1,28	1,18
3 (Endwert)	2,62	3,08
Zunahme (ml)	1,34	1,90
Zunahme COOH/100 Mol A.S.	3,88	5,50
Mittlere Kettenlänge A.S.	25,80	18,20

E. Diskussion der Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit bringt einen Beitrag zum Verhältnis Prokollagen-Kollagen. Während Prokollagen a) in verdünnter Essigsäure und b) in Wasserstoffbrückenbindungen spaltenden Agentien (Harnstoff, LiCl, KCNS) vollkommen löslich ist, geht unter den gleichen Bedingungen das Kollagen nur zu einem sehr geringen Anteil in Lösung. Da der Aufbau der Peptidketten beider Eiweißkörper im Wesentlichen identisch ist (gleiche Aminosäurezusammensetzung, gleiche Aminosäuresequenz und gleiches elektronenmikroskopisches Bild), muß man annehmen, daß der Unterschied zwischen Prokollagen und Kollagen nur durch die Art der Quervernetzung der Peptidketten im Molekül bedingt ist. Während das Löslichkeitsverhalten des Prokollagens allein durch die Annahme von Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatischen Anziehungen ausreichend erklärt werden kann, sind beim Kollagen zusätzlich echte chemische Bindungskräfte für die Quervernetzung zu fordern.

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, zwei Versuchsbe-

dingungen auszuarbeiten, unter denen auch reifes Kollagen bei Zimmertemperatur in hochmolekularer Form in Lösung gebracht werden kann. Die beiden Bedingungen sind: Oxydation mit Perjodat in essigsäurem Medium und Behandlung mit Hydroxylamin (pH 8,5). In beiden Fällen geht Kollagen in Lösung, wenn die Reaktion in Anwesenheit von Wasserstoffbrückenbindungen spaltenden Agentien durchgeführt wird (Tabelle 8 und 19).

Die Versuchsergebnisse, welche bei der Perjodatoxydation und der Hydroxylaminbehandlung von Kollagen in Gegenwart und Abwesenheit Wasserstoffbrückenbindungen spaltender Agentien erhalten worden waren, sind in Tabelle 30 zusammengestellt.

Bei der Oxydation mit Perjodat in Abwesenheit von Harnstoff werden in einer raschen Reaktion die Hexosen des Kollagens bis auf einen geringen Rest zerstört (Abbildung 21). Daneben werden Hydroxylysin, Tyrosin und Methionin in ihren Seitenketten angegriffen. Die übrigen Aminosäuren bleiben bis auf einige kleine Veränderungen (s. Tabelle 6 Seite 43) wie zum Beispiel beim Glycin, Alanin und Hydroxyprolin unverändert. Etwas größere Veränderungen in der Aminosäurezusammensetzung findet man allerdings, wenn Kollagen mit Perjodat-Harnstoff in Lösung gebracht und anschließend dialysiert wird. Diese Veränderungen dürften jedoch darauf beruhen, daß ein kleiner Teil (9,3 %) des gelösten Kollagens dialysierbar ist.

Der Schrumpfungspunkt des perjodatoxydierten Kollagens (in Abwesenheit von Harnstoff) ist um etwa 10°C erniedrigt (Tabelle 7). In heißem Wasser löst sich aber das oxydierte Material überraschendweise langsamer als unbehandeltes Kollagen (Abbildung 22). Das zuletzt genannte Verhalten kann kaum anders als durch die Annahme erklärt werden, daß die bei der Perjodatoxydation entstehenden Aldehydgruppen zu sekundären Vernetzungen führen.

Bei der Behandlung von Kollagen mit Hydroxylamin in Abwesenheit von Wasserstoffbrückenbindungen spaltenden Agentien gehen 1,22 Mol Hydroxamsäuren/100 Mol Aminosäuren zusammen mit etwa

Tabelle 30: Vergleichende Übersicht über das Verhalten von Kollagen gegen Perjodat und Hydroxylamin

Kollagen	NaJO_4 + Essig- säure(10%)	NH_2OH
a) <u>nativ:</u>		
Auflösung bei 40°C	4-5 Tg.: 100 %	19 Std.: 100 % (x)
20°C	2 Tg.: 6 % (Endw.)	8 Tg.: 12 %
Kohlenhydrate	12 Std.: 73,3 % zer- stört (Endwert)	unverändert
Aminosäuren	OH-Pro, Met und Tyr zerstört	unverändert
Schrumpfungspunkt	10°C erniedrigt	unverändert
Heißwasserlöslichkeit	erniedrigt	bei höheren Temp. leichter löslich
Löslichkeit in H-Spreng- ern b. 20°C (Nachbehand- lung)	3 Tg.: 15 % (Endw.)	8 Tg.: 28,3 %
b) <u>hitzedenaturiert:</u>		
Auflösung bei 20°C	8 Tg.: 100 %	1 Tg.: 100 %
c) <u>nativ + H-Sprenger:</u>		
Auflösung bei 20°C	6 Tg.: 100 %	12 Std.: 100 % (xx)
d) <u>Nacheinanderfolgende Einwirkung von Reagens und H-Sprenger:</u>		
Auflösung bei 20°C	6 Tg.: 6,3 %	8 Tg.: 28,3 %

Anmerkung: (x) Nach 2 Std. bei 37°C sind 1,22 Mol Hydroxamsäuren pro 100 Mol Aminosäuren des Kollagens in Lösung gegangen. Scharfer Endwert.

(xx) In Gegenwart von 4 m LiCl zusätzliche Bildung von 1,07 Mol Hydroxamsäuren pro 100 Mol Aminosäuren.

5 % des Trockengewichts in Lösung (Abb.29). Die Abspaltung der Hydroxamsäuren ist innerhalb von 2 Stunden beendet. Schrumpfungspunkt (Tab.16), Aminosäurezusammensetzung (Tab.15) und Kohlenhydratgehalt des ungelöst gebliebenen Anteiles ändern sich dabei praktisch nicht, die Heißwasserlöslichkeit findet man bei höherer Temperatur (96°C) deutlich gesteigert (Abb.30). Bei den abgespaltenen Hydroxamsäuren dürfte es sich also um ein Material handeln, das für die Struktur des Kollagens nicht von Bedeutung ist. Läßt man Hydroxylamin dagegen in Anwesenheit von LiCl oder ähnlichen Agentien auf Kollagen einwirken, so gehen die Fasern bereits bei Zimmertemperatur in hochmolekularer Form in Lösung. In dieser Lösung findet man 1,07 Mol Hydroxamsäuren pro 100 Mol Aminosäuren mehr als bei der Reaktion ohne LiCl (Tab.23). Die zusätzlich gebildeten Hydroxamsäuren haben sich offenbar erst in Gegenwart von LiCl bilden können, man kann ihnen eine Bedeutung für die Struktur des Kollagens zuschreiben.

Die Tatsache, daß Kollagen bei der Oxydation mit Perjodat und bei der Hydroxylaminbehandlung unter den angegebenen Bedingungen in weitgehend hochmolekularer, nicht dialysierbarer Form in Lösung geht, legt die Vermutung nahe, daß beidemale ein Angriff an einem Strukturelement erfolgt, welches höhermolekulare Untereinheiten des Kollagens verbindet oder vernetzt und dadurch für die Unlöslichkeit des Kollagens in den verschiedenen Eiweißlösungsmitteln verantwortlich ist. Perjodat ist spezifisch für 1,2-Glykolgruppierungen und verwandte Verbindungen wie 1,2-Aminoalkohole, α -Hydroxy- und α -Aminoketone. Hydroxylamin dagegen reagiert mit aktivierten Carbonylgruppen (Eestern, Anhydriden, aktivierten Amidn) unter Bildung von Hydroxamsäuren. Bei den Quervernetzungen des Kollagens sollte es sich also um ein Strukturelement handeln, das diese beiden Gruppierungen vereinigt. Von den Kollagenbausteinen, welche durch Perjodat zerstört werden, kommen für eine Brückenbindung zu Nachbarketten nur die Hexosen

in Frage. Hydroxylysin und Tyrosin könnten durch Perjodat nicht mehr angegriffen werden, wenn ihre Amino-bzw. Hydroxylgruppen in eine Quervernetzung eingebaut, also substituiert wären.

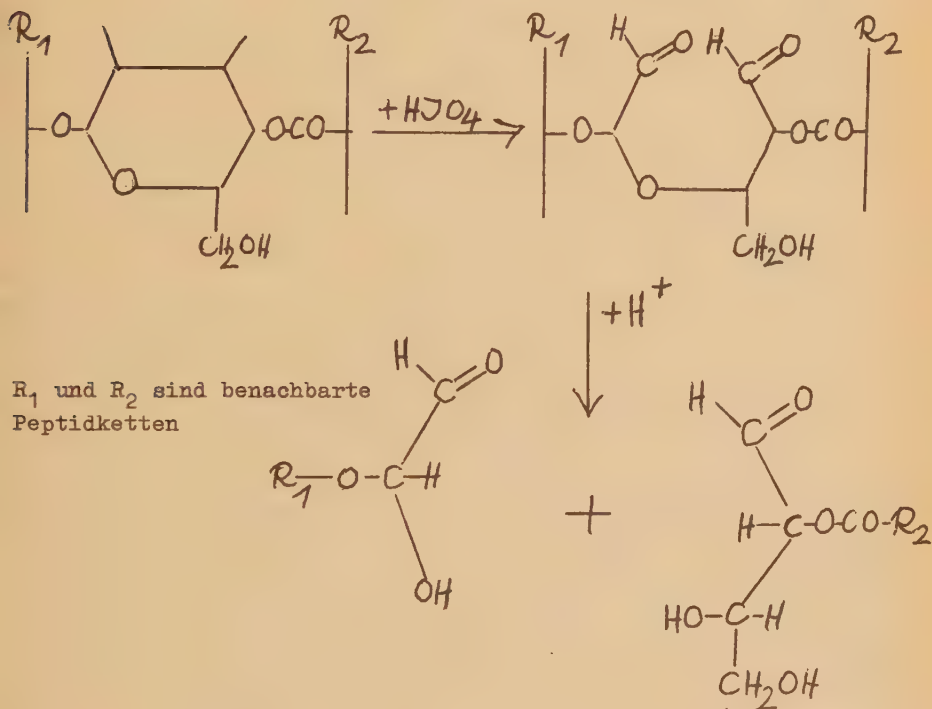
Eine Brückenbindung durch Kohlenhydrate kann man sich praktisch nur vorstellen, wenn neben einer glykosidischen Bindung auch mindestens eine Esterbindung an den Zuckern angreift.

Diese Überlegungen führen weiter zu dem Schluß, daß es sich bei der zweiten Reaktion, welche zu einer Auflösung von Kollagen führt, nämlich der Hydroxylaminreaktion, um einen Angriff auf Esterbindungen handelt, an welchen Hydroxylgruppen der Kohlenhydrate des Kollagens beteiligt sind. Die pH-Abhängigkeit der Auflösungsgeschwindigkeit entspricht durchaus dem Verhalten von Esterbindungen (vergleiche S.24, 60).

Diese Annahme findet eine starke Stütze in der Tatsache, daß in Rückständen, die bei der tryptischen Verdauung von denaturiertem Kollagen ungelöst bleiben und in denen die Hexosen des Kollagens (beispielsweise auf das 13 fache) angereichert sind, auch die hydroxylaminempfindlichen Bindungen in der gleichen Größenordnung wie die Hexosen vermehrt sind (Tab.24). Die Aminosäurezusammensetzung dieser Rückstände unterscheidet sich nach Untersuchungen von Hörmann und Nordwig (31) von der des Kollagens selbst praktisch nicht. Es handelt sich also durchaus noch um kollagenes Material.

Eine Quervernetzung von Peptidketten über Kohlenhydrate könnte man sich also derart vorstellen, daß die Zucker mit seitenständigen Hydroxylgruppen einer Peptidkette O-glykosidisch, mit seitenständigen Karboxylgruppen einer anderen Peptidkette esterartig etwa in Art der Abbildung 39 verbunden wären. Mit Hydroxylamin würde dann die Esterbindung aufgespalten, mit Perjodat der Zuckerrest zerstört, wobei bei der Perjodatoxydation zur endgültigen Lösung der Quervernetzung noch einige Folgereaktionen (Abb.39) anzunehmen wären, bei denen die verbleibenden Acetalbindungen durch Essigsäure aufgespalten werden.

Abbildung 39: Mögliche Quervernetzung zweier Peptidketten durch Kohlenhydrate und ihre Spaltung durch Perjodat



Für die reduzierenden Gruppen der Kohlenhydrate des Kollagens ist aus früheren Arbeiten an unserem Institut bekannt, daß sie nicht in freier Form und auch nicht N-glykosidisch vorliegen können (14), sodaß für die Annahme einer O-glykosidischen Bindung nichts im Wege steht. Freie reduzierende Gruppen und N-glykosidische Bindungen konnten auf Grund der Unfähigkeit des Kollagens mit Phenylhydrazin Osazone zu bilden, ausgeschlossen werden.

Bei der Annahme von Quervernetzungen der in Abbildung 39 wiedergegebenen Form stößt man vorerst jedoch auf einige Schwierigkeiten. Zum ersten findet man sowohl in Prokollagen als auch in

Kollagen hydroxylaminempfindliche Bindungen, wobei aber ihre Menge in Kollagen größer als in Prokollagen gefunden wurde (Tab.31).

Tabelle 31: Hydroxylaminempfindliche Bindungen und Hexosengehalt in Prokollagen u.Kollagen(vergl.dazu Tab.23)

	Hydroxylaminempfindliche Bindungen Mol/100 Mol Aminosäuren	Hexosen
Prokollagen	0,64	0,38 (x)
Kollagen	1,07	0,36 (xx)
Differenz	0,43	

- Anmerkung: (x) berechnet auf Glucose. Nach Befunden von Wolf(34) bestehen die Hexosen des Prokollagens in der Hauptsache aus Glucose neben wenig Mannose, welche bei der Anthronreaktion die gleichen Extinktionen geben.
- (xx) berechnet auf Glucose + Galaktose (1:1) , vergleiche Abbildung 16.

Es ist einleuchtend, daß nur die Differenz der hydroxylaminempfindlichen Bindungen von Kollagen und Prokollagen für diejenigen Quervernetzungen in Frage kommt, welche die Unterschiede zwischen Kollagen und Prokollagen, das heißt die Unlöslichkeit des Kollagens in Abwesenheit Wasserstoffbrückenbindungen spaltender Agentien, bedingen. Es muß sich dabei um Esterbindungen zwischen einzelnen Tropokollagenmolekülen handeln (intermolekulare Bindungen). Wie man aus Tab.31 entnehmen kann, stimmt dieser Differenzbetrag (0,43 Mol %) mit dem Kohlenhydratgehalt des Kollagens (0,36 Mol % (xx)) etwa überein. Größenordnungsmäßig hat man also beim Kollagen auf eine Kohlenhydratgruppierung zwei Esterbindungen, beim Prokollagen nur eine. Bei den hydroxylaminempfindlichen Bindungen des Prokollagens dürfte es sich um Bindungen innerhalb des Prokollagens (intramolekulare Bindungen) handeln, deren Natur vorerst noch unbekannt ist. Diese intramolekularen Bindungen sind offenbar neben den intermolekularen Quervernetzungen auch in Kollagen anzunehmen.

Aber auch die Deutung eines zweiten Versuches bereitet zunächst Schwierigkeiten. Wenn man Kollagen zuerst mit Perjodat in Abwesenheit von Harnstoff oxydiert, bis die Zerstörung der Kohlen-

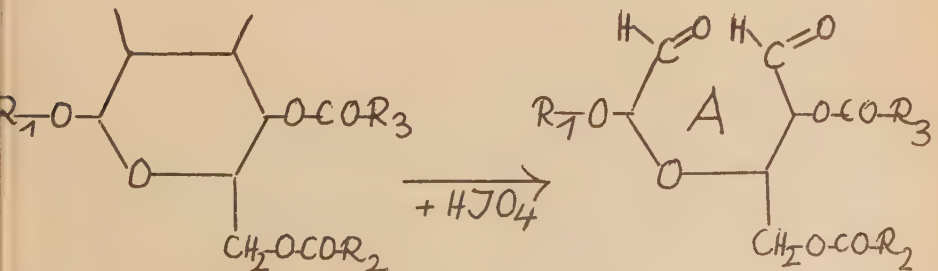
hydrate ihren Endwert erreicht hat und erst dann, nach Entfernung von Perjodat, Harnstoff-Essigsäure einwirken läßt, so geht Kollagen nicht in Lösung (Tab.9), obwohl man dies nach dem Reaktionsschema von Abb.39 erwarten sollte. Die Erklärung dieses Verhaltens würde auch bei der Annahme anderer perjodatspaltbarer Brückenglieder als Kohlenhydrate auf dieselbe Schwierigkeit stoßen.

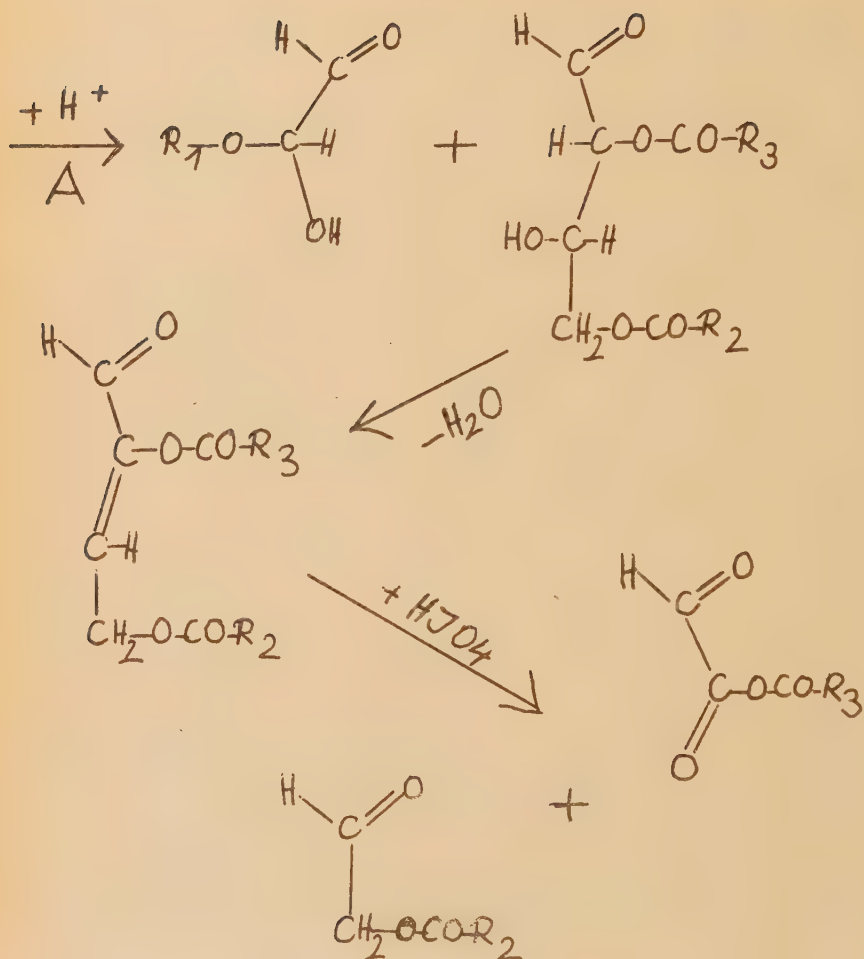
Der Versuch, dieses Ergebnis damit zu erklären, daß bei der Perjodatoxydation von Glykol-oder Aminoalkoholgruppierungen Aldehydgruppen gebildet werden, welche Anlaß zu sekundären Vernetzungsreaktionen des Kollagens geben, befriedigt nur teilweise. Läßt man nämlich auf Kollagen, welches nacheinander mit Perjodat und Harnstoff-Essigsäure behandelt worden war, noch einmal Perjodat und Harnstoff-Essigsäure gemeinsam einwirken, so wird ein nicht unbeträchtlicher Teil (Tabelle 9) aufgelöst.

Eine Möglichkeit, diese Schwierigkeit zu erklären, sehe ich in der Annahme, daß die Hexosen des Kollagens nicht nur an einer, sondern an zwei Hydroxylgruppen durch Esterbindungen substituiert sind. Für die zweite Esterbindung kämen aber nur mehr die intramolekularen Bindungen in Frage, welche sowohl in Prokollagen, als auch in Kollagen vorkommen sollen.

Unter der Annahme von zwei Esterbindungen an einem Kohlenhydratrest ergibt sich für die Perjodatauflösung von Kollagen nachstehender möglicher Reaktionsweg (Abbildung 40):

Abbildung 40: Reaktionsmechanismus bei der Spaltung einer zweifach mit Estergruppen substituierten Kohlenhydratbrücke in Kollagen mit Perjodsäure





Im ersten Oxydationsschritt wird die 1,2-Glykolgruppierung des Zuckers zerstört und anschließend mit Säure die Acetalgruppierung gelöst, an welcher die reduzierende Gruppe des Zuckers beteiligt war. Damit ist aber die Quervernetzung der Peptidketten noch nicht aufgehoben, sondern es bleibt noch eine Brücke zwischen

zwei von drei Ketten. Diese kann jedoch nach einer Wasserabspaltung durch einen zweiten Perjodatangriff auf die neu entstandene Doppelbindung zerstört werden. Bezüglich der Reaktion von Doppelbindungen mit Perjodat siehe Chatterjee (87).

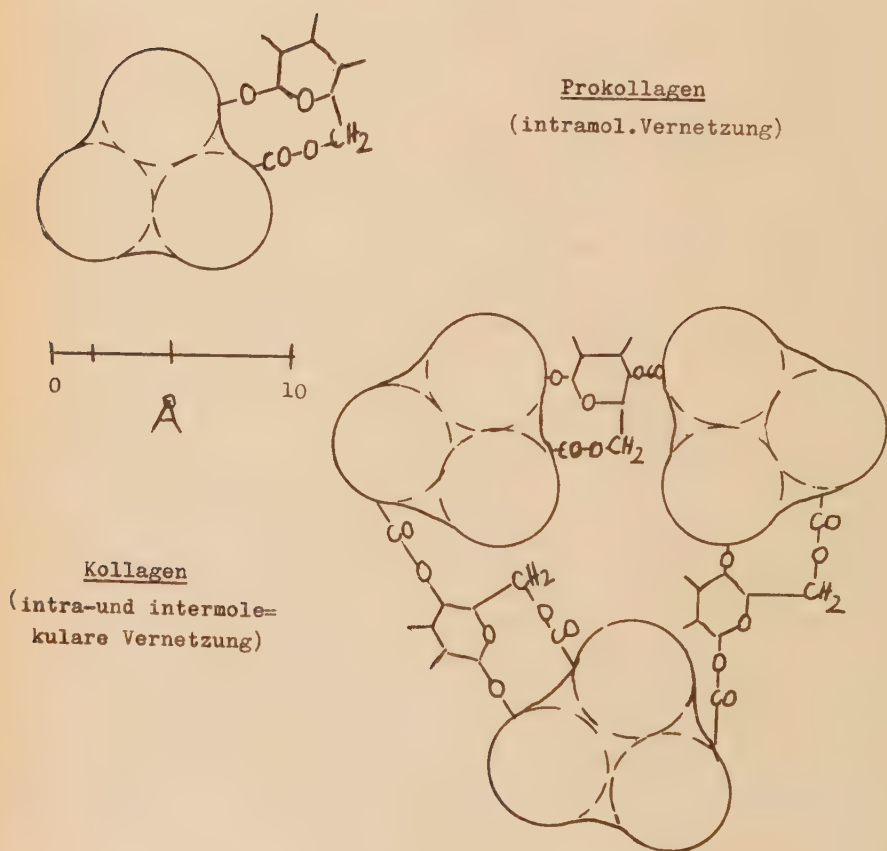
Der geschilderte mögliche Reaktionsmechanismus macht einen zweimaligen Angriff von Perjodat zur endgültigen Zerstörung der Quervernetzung notwendig. Wir können damit den oben erwähnten Versuchsbefund erklären, nach dem Kollagen nur durch gleichzeitige, nicht aber nacheinanderfolgende Einwirkung von Perjodat und Harnstoff-Essigsäure gelöst wird. Voraussetzung für diese Erklärung ist, daß die Hydrolyse der Acetalbindung nur in Gegenwart Wasserstoffbrückenbindungen sprengender Agentien (Harnstoff) erfolgen kann. Eine solche Annahme ist bei umkehrbaren Reaktionen im Eiweißverband nicht unberechtigt. Die Rückreaktion kann nämlich im nativen Eiweiß begünstigt sein, da die beiden Spaltstücke räumlich nicht getrennt werden. Denaturierend wirkende Agentien könnten diesem Effekt entgegenwirken.

Der über mehrere Stufen laufende Reaktionsmechanismus bei der Perjodatspaltung der Kohlenhydratquervernetzungen des Kollagens macht es verständlich, daß die Auflösung von Kollagen durch Perjodat-Harnstoff-Essigsäure wesentlich langsamer vor sich geht als die Auflösung durch Hydroxylamin-Lithiumchlorid.

Auf Grund der angeführten Überlegungen ist also zu postulieren, daß die Kohlenhydrate des Kollagens zweifach verestert sein sollen, wobei eine Estergruppierung intermolekular, eine zweite intramolekular etwa nach Art der Abbildung 41 anzunehmen wäre. Folgerichtig ist dann zu fordern, daß im Prokollagen nur eine Esterbindung, nämlich die intramolekulare am Zucker vorhanden sein soll.

Die Annahme, daß die Hexosen des Prokollagens einfach verestert sein sollen, wird durch Methylierungsversuche von Wolf(34) gestützt. Wolf konnte die Hexosen des Prokollagens nach Denaturieren des Eiweißkörpers und Trypsinverdauung anreichern, ähnlich wie dies beim reifen Kollagen in vorliegender Arbeit geschehen ist. Die Methylierung der angereicherten Hexosen ergab über 90 % Trimethylglucose (60 % 2.3.4.-Trimethylglucose und 35 % 2.3.6.-Trimethylglucose). Es ist also entweder die C₄-oder C₆ ständige

Abbildung 41: Vermutete Bindung der Kohlenhydrate in Prokollagen und Kollagen



Anmerkung: Außer den O-glykosidischen Bindungen und den Estergruppierungen sind alle Strukturelemente maßstabge-
recht gezeichnet.

Hydroxylgruppen des Zuckers einer einer Methylierung nicht zugänglich. An diesen Stellen könnte die Estergruppierung angreifen.

Die Forderung, daß in Kollagen zwei Estergruppen an einer Kohlenhydratvernetzung angreifen sollen, findet 2 Bestätigungen.

Zum ersten findet man, daß in einem Rückstand, welcher bei der tryptischen Auflösung von teilweise denaturiertem Kollagen hinterbleibt, und in dem die Kohlenhydrate angereichert sind, auch die hydroxylaminempfindlichen Bindungen konzentriert sind und daß das Verhältnis von Kohlenhydraten zu hydroxylaminempfindlichen Bindungen etwa 1: 2 entspricht (s. Tabelle 24).

Zum zweiten gelang es nicht, Kollagen mit Hydrazin unter den gleichen Bedingungen in Lösung zu bringen, unter denen Hydroxylamin reagiert (Tab. 27). Dagegen gelang der Versuch, mit Semicarbazid das Eiweiß aufzulösen. Offenbar reagiert das bifunktionelle Hydrazin mit beiden sterisch benachbarten Estergruppierungen gleichzeitig unter Vernetzung, während das monofunktionelle Semicarbazid nicht vernetzen kann. Das mit Hydrazin umgesetzte Kollagen kann mit Perjodat-Harnstoff-Essigsäure nur mehr teilweise in Lösung gebracht werden (Tabelle 26).

Die Esterbindungen des Prokollagens reagieren nach Versuchen von Gallop (22) mit Hydrazin innerhalb von 5 Stunden bei 37°C unter Bildung von Hydraziden. In Prokollagen ist nach den obigen Ausführungen nur eine Esterbindung an den Hexosen anzunehmen, sodaß für eine Quervernetzung durch Hydrazinbrücken nur eine geringe Wahrscheinlichkeit besteht.

Schwerer zu verstehen ist die Rolle der Wasserstoffbrückenbindungen spaltenden Agentien bei diesen Reaktionen. Ihre Anwesenheit ist für die Spaltung der an der Quervernetzung von Kollagen beteiligten Estergruppen unbedingt notwendig (s. Abb. 32), während sie beim Prokollagen entbehrlich sind. Bei der Perjodatoxydation verläuft die Oxydation zwar auch ohne Harnstoff (Abb. 21), denn die Kohlenhydrate lassen sich schon nach kurzer Einwirkung bis auf einen sehr geringen Rest nicht mehr nachweisen, aber es findet keine Auflösung statt. Im Sinne der oben zitierten Vorstellungen kann angenommen werden, daß die nachfolgende Hydrolyse der Acetalbindung gehemmt ist. Möglicherweise haben die denaturierend wirkenden Agentien die Wirkung, daß die bei der Reaktion entstehenden funktionellen Gruppen möglichst schnell räumlich voneinander getrennt werden,

um dadurch eine Folgereaktion zu verhindern, wodurch die Abbauprodukte erneut unlöslich werden.

Die Forderung, daß Kohlenhydrate ein vernetzendes Prinzip in Kollagen darstellen, macht auch den Versuch verständlich, daß sich die Kohlenhydrate in den unangreifbaren Rückständen anreichern, welche bei der tryptischen Auflösung von teilweise denaturiertem Kollagen hinterbleiben. Die Peptidketten des Kollagens sind in der Nähe der Quervernetzungen durch Wärme wesentlich schwerer zu denaturieren als in größerer Entfernung von ihnen, wie bei Betrachtung von Abbildung 42 unmittelbar einleuchtet.

Abbildung 42: Teilweise Denaturierung und anschließender Trypsinabbau von Kollagen (KH = Kohlenhydratquervernetzungen)



Rückstände nach Trypsinabbau

Durch Trypsin werden aber nur die denaturierten Anteile des Kollagens aufgelöst, die nativen hinterbleiben als unlöslicher Rückstand. In diesem sind dann die Quervernetzungen, das heißt die Kohlenhydrate angereichert (Tabelle 24).

Ein ähnliches Ergebnis wie bei der T⁴ypsinverdauung erhält man auch beim Abbau mit Elastase (30). Auch hier reichern sich die Kohlenhydrate in den schwerer denaturierbaren Bezirken an. Sogar beim Abbau mit Kollagenase, die Kollagen bereits in nativem Zustand abbaut, hinterbleibt ein geringer Rest von 3,5 %, in dem die Neutralzucker angereichert sind (31). Auch dieser Rückstand enthält noch sämtliche Aminosäuren des Kollagens, darunter auch Hydroxyprolin in einer Menge, wie sie in Kollagen selbst vorkommen. Es handelt sich also durchaus noch um kollagenes Material.

Über das Vorliegen intermolekularer Quervernetzungen im reifen Kollagen gibt es eine interessante quantitative Untersuchung von Reardon und Mitarbeitern (90). Die Autoren berechnen aus dem gummielastischen Verhalten von hitzedenaturiertem Kollagen, daß auf etwa 600 Aminosäuren zwei Vernetzungsstellen fallen müssen. Dieser Wert kommt der von mir gefundenen Zahl von 0,43 intermolekularen Esterbindungen pro 100 Aminosäuren (eine Quervernetzung pro 238 Mol Aminosäuren (Tab.31)) verhältnismäßig nahe.

Auch der von mir erbrachte Befund, daß Kollagen nach Oxydation mit Perjodat (in Abwesenheit von Harnstoff) einen niedrigeren Schrumpfungspunkt als normales Kollagen aufweist (Tab.7) paßt zur Vorstellung, daß die Kohlenhydrate an der Vernetzung der Kollagenfaser teilhaben.

Die Vorstellung, daß Kollagen durch Hauptvalenzbindungen vernetzt ist, hat in der letzten Zeit durch direkte Befunde eine gewisse experimentelle Stütze erfahren. Courts und Stainsby (89) konnten aus Gelatine verschiedene Fraktionen isolieren, bei denen die Menge der Aminoendgruppen im Verhältnis zum Mol-Gewicht dafür spricht, daß es sich um hochmolekulare Fraktionen mit mehreren Peptidketten handelt. Die Autoren sind der Meinung, daß die einzelnen Peptidketten durch Hauptvalenzbindungen verknüpft sind.

Für das Vorhandensein von Bindegliedern zwischen den einzelnen Peptidschrauben des Prokollagens spricht auch die Tatsache,

daß Prokollagen beim Denaturieren in zwei Komponenten mit Molekulargewichten von etwa 120 000 und 240 000 zerfällt (72). Das Mol-Gewicht des nativen Prokollagens beträgt nach Untersuchungen von Boedtker und Doty (97) 360 000. Die Befunde beim Denaturieren werden so gedeutet, daß sich die drei Peptidschrauben des Prokollagens auseinanderwickeln. Eine davon (Mol-Gewicht 120 000) wird frei, während die beiden anderen verbunden bleiben (240 000). Doty und Nishihara (72) konnten zeigen, daß die dimere Komponente beim Behandeln mit KCNS bei pH 12 verschwindet. Dieser Befund stellt ein Analogon zu unseren Versuchen mit Hydroxylamin dar. Er ordnet sich gut in das Vorstellungsbild von Abb.41 ein.

Nach Angaben von Gallop (22) soll das Molekulargewicht des Prokollagens nach Behandlung mit Hydroxylamin allerdings etwa 20 000 sein.

Meine eigenen Untersuchungen zum Molekulargewicht der mit Perjodat und Hydroxylamin erhaltenen Abbauprodukte haben wegen der geringen Sedimentationsgeschwindigkeit noch zu keinem auswertbaren Ergebnis geführt.

Schließlich ist darauf hinzuweisen, daß die vorliegenden Untersuchungen auch für das Verständnis des Kälkungsprozesses bei der Gelatineherstellung eine gewisse Bedeutung haben. Unter der Kalkeinwirkung wird Kollagen in eine beim Kochen lösliche Form übergeführt, das heißt nach dem vorher gesagten, daß Quervernetzungen gespalten werden. Offenbar wird aber nur ein Teil von ihnen angegriffen, denn in Gelatine findet man immer noch eine verhältnismäßig große Menge hydroxylaminempfindlicher Bindungen. Ihre Menge (0,76 Mol/100 Mol Aminosäuren (Abb.28)) entspricht etwa der in Prokollagen gefundenen Zahl von Hydroxamsäuren (0,64 Mol pro 100 Mol Aminosäuren, während im Kollagen 1,07 Mol gefunden wurden (Tabelle 13).

Bei den während des Kälkungsprozesses aufgespaltenen hydroxylaminempfindlichen Bindungen handelt es sich möglicherweise um die intermolekularen Quervernetzungen des Kollagens. Die an und für sich schlecht verständliche Tatsache, daß hydroxylaminempfindliche Bindungen durch Kalk schwer oder garnicht angegriffen werden, findet dadurch eine befriedigende Erklärung, daß diese Bindungen in Kollagen maskiert vorliegen und einer Reaktion nur in Gegenwart denaturierend wirkender Agentien zugänglich sind. Tatsächlich

ging bei Zusatz von LiCl zur Kalkbrühe Kollagen bei Zimmertemperatur allmählich vollkommen in Lösung (Tab.28). Nach dem Abdialysieren von LiCl hinterblieb das gelöste Material als Gelatine, die jedoch zum Unterschied von normal hergestellter Gelatine keine hydroxylaminempfindlichen Bindungen mehr besaß.

F. Experimenteller Teil

1.) Darstellung von Kollagen: (nach Graßmann et al.(32))

Etwa 600 g gereinigter Mittelspalt wurden tiefgefroren, in kleine Streifen geschnitten, im Fleischwolf unter Eiszusatz zer kleinert und im gekühlten Starmix homogenisiert.

a) Entfernung der nichtkollagenen Proteine mit Trypsin: Der fein verteilte Mittelspalt (Stirnhaut eines Stieres) wurde in 3 Ltr. 0,1 % iger Trypsinlösung suspendiert. Als bakteriostatisches Agens wurde Thymol(0,1 %ig) zugesetzt. Dann wurde mit n/10 NaOH das pH 7,8 - 8,0 eingestellt und die Suspension 20 Std. bei 37°C unter Korrektur des pH incubiert. Nach beendigem Abbau wurde zentrifugiert.

b) Entfernung der Mucopolysaccharide mit Kalkmilch: Der oben erhaltene, mehrmals mit Wasser (+4°C) gewaschene Rückstand wurde 4 x mit gesättigter Kalkmilch (etwa 1 stündige Einwirkung unter häufigem Schütteln) extrahiert.

c) Entfernung des überschüssigen Kalks durch Ansäuerung: Der nach der Äscherung verbleibende, mehrmals mit Wasser (+4°C) gewaschene Rückstand wurde in 3 Ltr. Azetatpuffer suspendiert und durch tropfenweisen Zusatz von 25 %iger Essigsäure das pH 5 eingestellt und 3 Std. aufrechterhalten. Dieser Vorgang wurde nach dem Zentrifugieren noch einmal wiederholt.

d) Endwäsche und Trocknung des Kollagens: Der oben erhaltene 4 x mit Wasser (+4°C) gewaschene Rückstand wurde 2 x mit jeweils 3 Ltr. abs. Äthanol/Äther (1:1) behandelt. Das so gereinigte Kollagen wird einige Tage im evakuierten Exsikkator über P₂O₅ getrocknet.

Zusammensetzung des Azetatpuffers (pH 5):

(Ansatz für 1 Ltr.)

300 ml n/10 Essigsäure + 700 ml n/10 Natriumazetatlösung

2.) Hydrolyse von Proteinen mit dem Austauscher Dowex 50-X8:

a) Vorbehandlung des Austauschers: Das ausgesuchte Austauscherharz Dowex 50-X8 wird über Nacht in n HCl suspendiert und dann solange mit dest. Wasser gewaschen, bis keine Cl⁻ mehr nachweisbar sind.

b) Hydrolyse des Eiweißes und Isolierung der Zucker: Etwa 10 mg Kollagen werden mit 2 ml wässriger Aufschlammung des vorbehandelten Austauschers 24 Std. bei 100 °C hydrolysiert. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur trennt man die Lösung vom Austauscher (mit Nutsche oder durch Zentrifugieren) und bringt das Hydrolysat im evakuierten Exsikkator über P_2O_5 und KOH zur Trockne.

Der so erhaltene Rückstand wird in 0,050 ccm Wasser gelöst. Man entnimmt aliquote Teile, deren Menge auf den zu erwartenden Zuckergehalt abgestimmt ist und chromatographiert wie üblich. Zur Chromatographie sollen nicht mehr als 0,2 μ Mol pro Zuckerkomponente aufgetragen werden.

3.) Die Hexosenbestimmung mit Anthron nach Yemm und Willis (36):

a) Hexosenbestimmung an Kollagen: Man pipettiert 5 ml Anthronreagens in Kolorimetergläschen und kühlt mit Eiswasser. Dann unterschichtet man vorsichtig mit 1 ml Test- bzw. Untersuchungslösung, schüttelt gut durch und stellt die Gläser weitere 5 Minuten in Eiswasser. Dann werden sie 10 Minuten in heftig siedendes Wasser gestellt, anschließend in das Eiswasser gebracht. Nach 30 Minuten werden die Extinktionen bei 625 m μ und 700 m μ gegen eine im Versuch mitgelaufene Blindprobe gemessen. Die Differenz der Extinktionen ist der Zuckermenge proportional. (Die Extinktionswerte für Glucose und Galaktose unterscheiden sich nach Befunden von Yemm und Willis ziemlich stark!)

b) Hexosenbestimmung an oxydiertem Kollagen: Für die Zuckerbestimmung an oxydiertem Kollagen muß die Methode modifiziert werden, da die bei der Oxydation mit Perjodsäure entstandenen Jodidationen stören. Bei der Umsetzung mit dem schwefelsäurehaltigen Reagens werden die Jodjone zu Jod oxydiert, das die Lösung dunkel färbt und somit die kolorimetrische Messung unmöglich macht. - Die nach der Perjodatoxydation erhaltenen Rückstände werden 3 x mit Wasser gewaschen und dann zur Entfernung des überschüssigen Perjodats solange mit schwefliger Säure (1,0 %ige $Na_2S_2O_5$ -Lös.) behandelt, bis die anfangs durch Jodabscheidung braun gefärbten Eiweißproben wieder vollständig entfärbt sind. Dann wird zentrifugiert. Nach mehrmaligem Waschen mit Wasser werden die Rückstände in wenig Wasser suspendiert und die noch vorhandenen Jodidjone mit Silbersulfat gefällt. Dann bringt man das Ganze im evakuierten Exsikkator zur Trockne und führt wie oben beschrieben die Hexosenbestimmung durch. (Vor der kolorimetrischen Messung muß AgJ durch Zentrifugieren entfernt werden!)

4.) Die Papierchromatographie von Zuckern:

Als Chromatographiebehälter kommen Glasküvetten (32x38x10 cm) zur Verwendung. Alle Chromatogramme werden nach der aufsteigenden Technik ausgeführt. Als Papiere werden die Nr. 2040 a oder b der Firma Schleicher und Schüll verwendet. Das für die Chromatographie der

Zucker des Kollagens in dieser Arbeit verwendete Lösungsmittel ist Butanol-Pyridin-Wasser=6:4:3. Gelegentlich werden zur besseren Trennung von Glucose und Galaktose die Chromatogramme nach vorherigem Trocknen noch einmal mit demselben Lösungsmittel entwickelt (also zweidimensionale Trennung). Als Sprühreagens für reduzierende Zucker findet Anilinphthalat Verwendung.

Darstellung des Sprühreagens: 1,66 g Phthalsäure krist. Merck und 0,93 g Anilin zur Analyse Merck werden in 100 ml mit Wasser gesättigtem Butanol normal zur Chromatographie Merck gelöst. Etwa sich ausscheidende Kristalle werden durch Zugabe etwas Eisessig wieder in Lösung gebracht. Nach dem Besprühen des im Exhaustor getrockneten Chromatogramms mit Anilinphthalatlösung wird 10 Minuten auf 105°C erwärmt. Aldopentosen werden rotbraun angefärbt (rote Lumineszenz im U.V.), andere Zucker olivbraun (gelbe Lumineszenz). Methylierte Zucker und Uronsäuren geben ebenfalls charakteristische Farben, Fructose ist als gelb lumineszierender Fleck im U.V. erkennbar.

5.) Die Bedingungen der Löslichkeitsversuche:

a) Perjodatabbau von Kollagen: 20 mg Kollagen werden in 3 ml 10 %iger Essigsäure (enthaltend 0,02 m NaJO_4) suspendiert und 24 bzw. 48 Std. oder auch 7 Tg. bei Zimmertemperatur in der Dunkelheit inkubiert. Der nach c) aufgearbeitete Rückstand oder das Ausgangskollagen wird mit den in den Tabellen angegebenen Lösungen (jeweils 3 ml, in denen alle Agentien enthalten sind) bei der angegebenen Temperatur extrahiert.

b) Hydroxylaminabbau von Kollagen: 20 mg Kollagen werden in 3 ml 6 m LiCl (bzw. Wasser) suspendiert und 1 ml Hydroxylamin.HCl Lösung (0,5 ml 30 % $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ + 0,5 ml 15 % NaOH) zugesetzt. Temperatur: 20 oder 37°C. pH während der Umsetzung 8,5 (ständig kontrollieren, Glas fest verschließen!). Weitere Aufarbeitung siehe c).

c) Die Aufarbeitung der Rückstände: Nach beendeter Umsetzung wird das Reaktionsgemisch 10-20 Minuten zentrifugiert und die erhaltenen Rückstände mit Wasser sauber gewaschen. Anschließend wird mit 3 ml des angegebenen Lösungsmittels extrahiert. Dann wird wieder mit Wasser nachgewaschen und einigemal mit Äthanol behandelt. Die so erhaltenen Rückstände werden im evakuierten Exsikkator über P_{205} getrocknet.

d) Auflösung von Kollagen in Kalkmilch in Gegenwart von LiCl: 30 g im Starmix homogenisiertes Kollagen werden in 700 ml Mischscher (700 ml gesättigte Kalkmilch, 119 g LiCl enthaltend) bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach etwa 4 Wochen ist alles bis auf einen kleinen Rest in Lösung gegangen. Nach dem Zentrifugieren wird die überstehende Lösung mit HCl auf pH 7 gebracht und 3 Tage gegen Wasser im Kühlraum dialysiert. Dann wird bei tiefer Temperatur (Toluolzusatz) im Vakuum eingeengt und die sirupöse Lösung auf gekühlte Glasplatten gegossen.

e) Isolierung des Hydroxylaminabbauproduktes: Das nach etwa 12 Std. bei Zimmertemperatur in Lösung gegangene Material wird zur Entfernung von LiCl und NH_4OH 2 Tage gegen Wasser dialysiert und anschließend durch Gefrier Trocknung isoliert.

6.) Der Perjodatabbau von Kollagen bei 40°C:

554,3 mg Kollagen wurden mit 50 ml 0,02 m NaJO_4 essigsaurer (10%) Lösung 5 Tg. bei 40°C inkubiert (in der Dunkelheit). Dann wurde der Rückstand (AR) abzentrifugiert, gewaschen und getrocknet. Die Abbaulösung wurde einige Tage gegen Wasser von + 4°C dialysiert.

Extraktion des Rückstandes (AR) mit Chloroform-Methanol: Der oben erhaltene Rückstand (2,4 mg = 0,43 %, bezogen auf das eingesetzte Kollagen) wurde 3 Std. mit dem Gemisch Chloroform-Methanol (3:1) in der Siedehitze (80-90°C) extrahiert. Die heiße Lösung wurde sofort (Abzug) filtriert und eingedampft. Rückstand: 1,0 mg = 41,6 %, bezogen auf AR.

7.) Die Bestimmung des Schrumpfungspunktes von Kollagen:

Die Ausführung erfolgt in Anlehnung an die Vorschrift von Borasky-Nutting (65) und Gebhardt (66).

Etwa 5 mm lange möglichst dünne Kollagenfasern werden in ein normales Schmelzpunktsröhrchen gebracht. Dann läßt man mittels des Kapillareffektes Wasser einsaugen und schmilzt vorsichtig beide Enden zu. Nach Einbringen der Kapillare in eine Schmelzpunktsapparatur erhitzt man langsam bei einem Temperaturanstieg von 2-3°C pro Minute und ermittelt unter dem Stereomikroskop den Schrumpfungspunkt. Als Schrumpfungspunkt (T_s) wird die Temperatur in °C verstanden, bei welcher sich die Eiweißfaser nach kurzer Dehnung ruckartig zusammenzieht.

8.) Der Trypsinabbau von partiell denaturiertem Kollagen:

3,2619 g Kollagen wurden in 30 ml Wasser suspendiert und etwa 20 Minuten bei 65-75°C denaturiert. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wurden 50 mg Trypsin (Trypure novo, Firma Novo Industri A/S Kopenhagen) zugegeben und mit n/10 NaOH das pH 8 eingestellt. Als bakteriostatisches Agens wurde Toluol zugesetzt. Dann wurde das Ganze etwa 48 Std. bei 37°C inkubiert und von Zeit zu Zeit das pH Zusatz von Lauge korrigiert. Nach beendetem Abbau wurde zentrifugiert. Die überstehende Lösung (L_1) wurde gefriergetrocknet und der Rückstand (R_1) 3 x mit Wasser, 3 x mit Athanol und 1 x mit Aceton gewaschen und im evakuierten Exsikkator über P_2O_5 getrocknet. Der verbleibende Rückstand (R_1) wurde nach Entnahme der Proben für die Hexosen- und Stickstoffbestimmungen in 10 ml Wasser suspendiert und erneut etwa 10 Minuten bei 70-80°C denaturiert. Nach Abkühlung auf Zimmertemperatur wurden 20 ml Wasser zugesetzt, das 50 mg Trypsin enthielt. Nach Zusatz einiger Tropfen Toluol und Einstellen des pH auf 8 wurde wieder 48 Std. bei 37°C inkubiert. Die weitere Behandlung der Abbauprodukte erfolgte wie vorher beschrieben.

9.) Die Ausführung der quantitativen Esterbestimmung mit Hydrxyl-
amin:

a) Eiweißprobe: 20 - 100 mg Eiweiß (Kollagen, Prokollagen, Gelatine) werden in 2 ml 6 M LiCl (bzw. Wasser) suspendiert. Zu dieser Mischung gibt man 1 ml Reaktionslösung (gl. Vol. Tl. 30 %ige wässrige $\text{NH}_4\text{OH} \cdot \text{HCl}$ Lösung und 15 %ige NaOH-Lösung) und inkubiert 2 oder 3 Std. bei 37°C. pH 8,5. (Die Hydroxylaminlösung ist nicht haltbar und muß unmittelbar vor Gebrauch zusammengesetzt werden!)

b) Testlösung: Zu 2 ml 6 M LiCl-Lösung (bzw. Wasser), 10 μMol Hippursäureäthylester enthaltend, gibt man 1 ml Reaktionslösung (siehe oben) und inkubiert analog a).

c) Blindlösung: Zu 2 ml 6 M LiCl-Lösung (bzw. Wasser) gibt man 1 ml Reaktionslösung (s. oben) und inkubiert analog a).

Nach Abkühlung auf Zimmertemperatur setzt man den Proben a, b, c je 1 ml 3 N HCl und 1 ml 4 %ige wässrige FeCl_3 -Lösung zu (gut durchschütteln) und mißt sofort bei 500 m μ (Absorptionsmaximum) und 700 m μ (Absorptionsminimum) gegen Blindlösung.

Anmerkung: Es ist zu empfehlen, bei jeder Bestimmung einen Test und eine Blindprobe unter den gleichen Bedingungen mitlaufen zu lassen, da die Farbtiefe der Umsetzungslösung neben der Menge der gebildeten Hydroxamsäuren auch noch von der Konzentration der verwendeten FeCl_3 -Lösung abhängig ist. Es muß also unbedingt für die Eiweißprobe, Testlösung und Blindlösung die gleiche FeCl_3 -Lösung verwendet werden. Es wird deshalb abgeraten, für die Auswertung der Meßergebnisse eine Eichkurve zu verwenden. Es wird weiter empfohlen, während der Umsetzung der Substanzen mit NH_4OH die Kolorimetergläser fest zu verschließen, da bei dem angegebenen pH Lithiumchlorid mit der Kohlensäure der Luft unter Bildung von Li_2CO_3 reagiert, was zur Folge hat, daß bei der anschließenden Säurezugabe CO_2 in Freiheit gesetzt wird, was die Messung erschwert. Sollten sich Gasblasen bilden, dann ist mehrmaliges Umschütten des Küvetteninhaltes erforderlich, um die Lösungen für die Messung brauchbar zu machen.

10.) Alkalimetrische Verfolgung der Einwirkung von Trypsin auf
das Hydroxylaminabbauprodukt des Kollagens:

a) Hydroxylaminabbau des Kollagens: 862,35 mg Kollagen wurden in 15 ml Wasser (2,544 g LiCl und 1,5 g $\text{NH}_4\text{OH} \cdot \text{HCl}$ und 0,75 g NaOH enthaltend) suspendiert und bei 37°C solange inkubiert, bis alles in Lösung ging. Anschließend wurde gegen Wasser dialysiert, das pH 8,2 eingestellt und der Schlauchinhalt auf 25 ml aufgefüllt.

b) Vorbehandlung des Trypsin: Das verwendete Präparat Trypure novo (Firma Novo Industrie, Mainz) enthielt 33 % Chymotrypsin, das durch Säurebehandlung zerstört werden muß. -29,4 mg Trypsin wurden in 9 ml 0,16 N HCl 24 Std. bei 37°C inkubiert. Nach Einstellen des pH auf 8,2 wurde auf 10 ml aufgefüllt.

c) Alkalimetrische Analyse: 21 ml der bei a) erhaltenen Abbau-
lösung wurden mit 10 ml vorbehandelter Trypsinlösung b) versetzt. Für
die Titrationen wurden jeweils 3 ml entnommen. Die erste Messung
(Ermittlung des O-Wertes) erfolgte unmittelbar nach der Zugabe der
Enzymlösung. Die weiteren Meßpunkte sind aus Abb.38 zu entnehmen.
Konzentration der Proben: 70,08 mg Abbauprodukt/3 ml Lösung.

d) Titration nach Graßmann und Heyde: Jeweils 3 ml Abbau-
lösung (aus c) werden mit 5 Tropfen 0,1 %iger alkoholischer Thymolphthalein-
lösung versetzt und mit n/50 90 %iger alkoholischer KOH-Lösung bis
zum Umschlag nach blau titriert. Dann gibt man 9 ml siedenden Alkohol
zu, wobei sich die Lösung entfärbt und titriert wieder bis zum Um-
schlag. Nach erneutem Zusatz von 9 ml siedenden Alkohol wird noch
einmal bis zur Blaufärbung titriert und der Gesamtverbrauch an Lauge
notiert.

e) Auswertung: Der Laugeverbrauch, der allein der Zunahme der
Karboxylgruppen entspricht, errechnet sich aus der Differenz Gesamt-
laugeverbrauch - Laugeverbrauch des O-Wertes. Unter O-Wert versteht
sich der Anteil an Lauge, welcher zu Beginn der Enzymeinwirkung vom
Hydroxylaminabbauprodukt und dem Trypsinpräparat verbraucht wurde.

11.) Die Berechnung der Sedimentationskonstante:

Die Sedimentationskonstante von Eiweißkörpern läßt sich durch
Auswertung der Schlierenmethode nach Philpot-Svensson (62) aus der
auf Normalbedingungen reduzierten Formel

$$1) \quad s_{20} = \frac{\Delta z}{\Delta t} \cdot \frac{1}{\omega^2} \quad [s] \quad \text{berechnen.}$$

$$\omega = \text{Winkelgeschwindigkeit} \quad [sec^{-1}], \Delta t = \text{Laufzeit} \quad [sec]$$

Die Werte für Z werden aus dem in der Ultrazentrifuge erhaltenen
Schlierendiagramm nach Formel 2) bestimmt.

$$2) \quad z = \frac{2 \Delta x}{x_t + x_o} \cdot \frac{\eta_t}{\eta_{20}}$$

η_t = Viskosität der Lösung bei $t^\circ C$

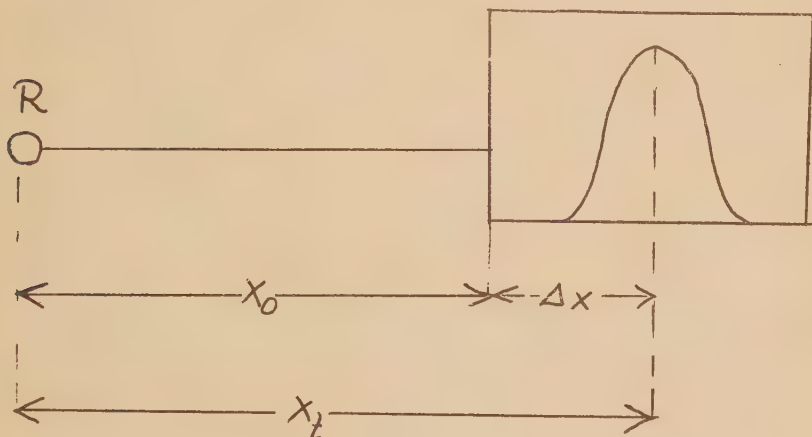
η_{20} = Viskosität der Lösung bei $20^\circ C$

x_o = Entfernung des inneren Küvettenrandes vom Rotations-
zentrum R, bei der Phywe Ultrazentrifuge = 5,765 cm

x_t = Entfernung des Gradienten von R zur Zeit t. $\Delta x = x_t - x_o$

Die folgende Abbildung möge diese Werte besser erklären:

Abbildung 43: Schematische Darstellung der in Gleichung 2) verwendeten Meßgrößen



Um die Werte für ΔX aus der photographischen Aufnahme entnehmen zu können, muß zunächst der Vergrößerungsmaßstab F des erhaltenen Bildes ermittelt werden.

$$F = \frac{\text{Länge des Photos}}{\text{Länge der Zelle}} = \frac{L_{\text{phot}}}{L} \left[\frac{\text{cm}}{\text{cm}} \right]$$

Die Länge der Zelle in der Phywe Ultrazentrifuge beträgt $L = 1,47 \text{ cm}$. Aus diesen Werten läßt sich nunmehr ΔX berechnen.

$$\Delta X = \frac{\Delta x_{\text{phot}}}{F} \quad [\text{cm}]$$

Δx_{phot} = auf der photographischen Platte (oder Bild) gemessener Abstand des Gradienten vom Bezugspunkt nach der Zeit t .

In Tabelle 31 sind die durch Ausmessen des Schlierendiagramms ermittelten Wanderungswege Δx_{phot} und die daraus berechneten Werte für

ΔX und Z wiedergegeben.

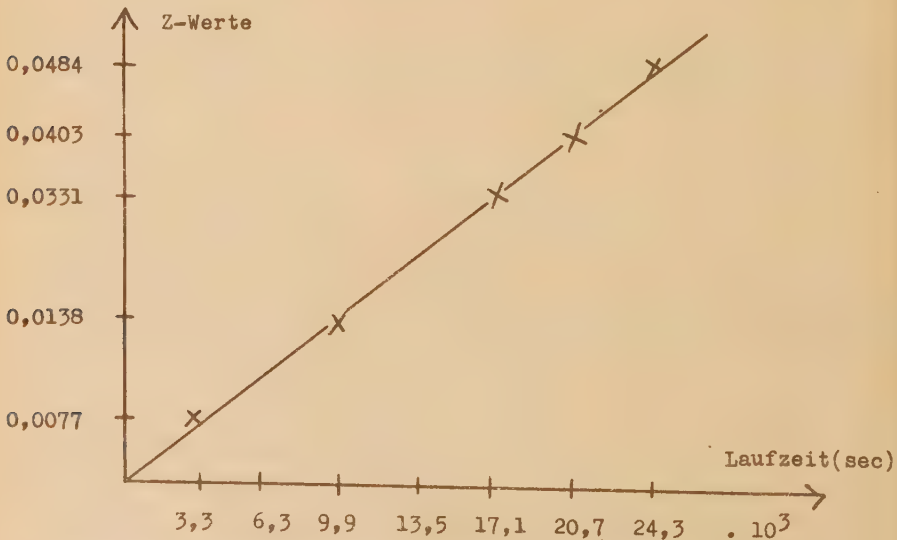
Tabelle 31: Experimentelle Werte für die Berechnung der Sedimentationskonstante des Perjodatabbauproduktes von Kollagen

(U/min: 51 000 = 858 U/sec. = 2 U/sec = 5 400. $^2 = 2,916 \cdot 10^7$)

Bild Nr.	Δt	ΔX_{phot}	L_{phot}	F	ΔX	Z
1	3300 sec	0,80 mm	2,62 cm	1,782	0,0448 cm	0,00775
2	4800	1,00	2,62	1,782	0,0561	0,00970
3	6300	1,35	2,62	1,782	0,0757	0,01380
4	9900	1,90	2,58	1,755	0,1082	0,01860
5	13500	2,60	2,52	1,712	0,1520	0,02620
6	17100	3,30	2,50	1,700	0,1961	0,03310
7	20700	4,00	2,48	1,686	0,2372	0,04030
8	24300	4,80	2,47	1,680	0,2860	0,04840

Trägt man die Z-Werte in ein Koordinatensystem ein, so ergibt die Verbindungslinie der einzelnen Meßpunkte eine Gerade, woraus auf die gute Übereinstimmung der Messungen zu schließen ist (Abb.44).

Abbildung 44: Sedimentationsdiagramm des Perjodatabbauproduktes von Kollagen



Für die Berechnung des Wertes $\frac{\Delta Z}{\Delta t}$ wurde der Wert $Z_7 = 0,0403$ herangezogen, der sehr gut auf der Geraden liegt.

Bei diesem Meßpunkt beträgt $\Delta t = 20\ 700$. Aus den bekannten Daten läßt sich nunmehr aus Gleichung 1) die Sedimentationskonstante berechnen:

$$S_{20} = \frac{\Delta z}{\Delta t} \cdot \frac{1}{\omega^2} = \frac{0,0403}{20\ 700} \cdot \frac{1}{2,916 \cdot 10^7}$$

$$\underline{\underline{S_{20} = 0,66 \cdot 10^{-13} \left[\text{sec} \right] = 0,66 \left[\text{s} \right]}}$$

12.) Die Bestimmung von Hexosaminen in Geweben nach Boas (74):

a) Austauschersäulen: Man verwendet etwa 25 cm lange Säulen mit einem ungefähren Durchmesser von 10 mm.

b) Vorbehandlung des Austauschers: Der Austauscher Dowex 50 (250-500 mesh) wird einigemal mit 2 n HCl und 2 n NaOH (zuerst mit lauge, dann mit Säure) behandelt und dann mit Wasser sauber ausgewaschen. Das abgenutzte Harz wird mit Wasser im Verhältnis 1:1 gemischt. Von dieser Suspension pipettiert man unmittelbar nach dem Durchschütteln 5 ml in die Austauschersäule.

c) Hydrolyse der Eiweißprobe: Die Probe (100-1500 Gamma Hexosamin enthaltend) wird mit 3 ml 4n HCl 15 Std. bei 100°C hydrolysiert. Nach dem Abkühlen auf Z.Temp. wird das Hydrolysat in einen 50 ml Meßkolben übergeführt.

d) Abtrennung der basischen Zucker: Man pipettiert 10 ml der obigen Hydrolyselösung auf die Säule und wäscht nach dem Einsickern mit 10 ml Wasser nach. Anschließend eluiert man die Zucker mit 2n HCl, die sich in den ersten 6 ml Eluat finden.

e) Kolorimetrische Hexosaminbestimmung: Man pipettiert 3 ml der zu untersuchenden Lösung in graduierte Probiergläser. Mit einem Tropfen Phenolphthaleinlösung als Indikator gibt man 4n NaOH zu je dem Glas, bis der Indikator gerade umschlägt. Dann gibt man 0,5n HCl zu, bis die Indikatorfarbe gerade verschwindet. Um die gleiche Salzkonzentration in allen Proben zu erreichen, gibt man bei den Standard- und Blindwertproben ein gleiches Volumen 4 m NaCl-Lösung zu wie bei den anderen Proben 4n NaOH. Dann macht man mit Wasser alle Probiergläser gleichvolumig. Hierauf gibt man 1 ml Acetylacetonlösung (2 % Lösung Vol./Vol. von Acetylaceton in 1n Na₂CO₃-Lösung) zu. Die Bestimmungsröhrchen werden mit Glasstopfen verschlossen und 45 Minuten in ein Wasserbad von 89-92°C gestellt. Nach Abkühlung der Gläser gibt man 2,5 ml Methanol zu und versetzt nach dem Schütteln mit 1 ml Ehrlich's Reagens (2,67 % Gew./Vol. p-Dimethylaminobenzaldehyd in 1:1 Gemisch Äthanol/HCl conc.). Nach gründlichem Schütteln werden alle Proben auf das gleiche Volumen mit Methanol gebracht. 1-2 Std. nach Zugabe des Ehrlich'schen Reagens werden die Extinktionen bei 530 mμ und 600 mμ gegen einen im Versuch mitlaufenden Reagensblindwert gemessen. Ein Glucosaminstandard mit 50 oder 20 Gamma dient als Vergleich zur Berechnung.

f) Regenerierung der Säule: Man behandelt die Säule mit 12 ml 2n NaOH und regeneriert nach kurzem Wasserdurchsatz mit 15 ml 2n HCl. Etwa 4 ml der Säure werden auf der Säule belassen und erst kurz vor erneutem Gebrauch durchlaufen gelassen.

13.) Die Uronsäurebestimmung nach Dische (73):

Unter Kühlung mit Eiswasser gibt man zu 1 ml Probelösung (enthaltend 5-100 Gamma Uronsäurelacton) 6 ml H_2SO_4 conc. und erhitzt 20 Minuten in einem heftig siedenden Wasserbad.²₄ Dann kühlt man auf z.Temp.ab und setzt 0,2 ml einer 0,1 %igen Lösung von Carbazol in Äthanol zu. Nach 2 Std. mißt man möglichst schnell die Proben und die Testlösungen gegen einen entsprechenden Blindwert bei 530 m μ und 600 m μ . Die Differenz der Extinktionen dient mit den Vergleichsproben zur Berechnung.

G. Zusammenfassung

In vorliegender Arbeit wurde die Bedeutung der geringen Menge an Hexosen, die an Kollagen fest gebunden sind, für die Struktur des Faserproteins untersucht. Die Untersuchungen wurden auf folgenden Wegen durchgeführt:

- 1.) Bei der Einwirkung von Perjodat auf reifes Kollagen in essigsaurem Medium werden die Hexosen bis auf einen kleinen Rest zerstört. Führt man die Oxydation in Anwesenheit von Harnstoff durch, so geht das Eiweiß bei Zimmertemperatur hochmolekular in Lösung.
- 2.) Bei der Umsetzung von reifem Kollagen mit Hydroxylamin geht Kollagen in Anwesenheit von H-Sprengern bei Zimmertemperatur ebenfalls in hochmolekularer Form in Lösung. In der Abbaulösung lassen sich Hydroxamsäuren (1,90 Mol/100 Mol Aminosäuren) nachweisen, was für das Vorliegen von Esterbindungen im nativen Kollagen spricht. Ein Teil dieser Hydroxamsäuren (1,07 Mol/100 Mol Aminosäuren) wird nur bei der Reaktion in Gegenwart von H-Sprengern oder nach vorhergehender Hitzedenaturierung von nativem Kollagen gebildet. Die entsprechenden Esterbindungen sind offenbar maskiert. Wenn diese Esterbindungen gespalten werden, geht Kollagen in Lösung. Auf ein Mol Hexosen treffen etwa zwei Mole maskierte Esterbindungen bzw. Hydroxamsäuren.

Im löslichen Kollagen (Prokollagen) wurde eine geringere Menge an hydroxylaminempfindlichen Bindungen gefunden (0,64 Mol pro 100 Mol Aminosäuren oder etwas mehr als 1 Mol pro 1 Mol Hexose). Der Differenzbetrag an Esterbindungen zwischen Kollagen und Prokollagen wird intermolekularen Esterbindungen zugeschrieben.

- 3.) Bei der Auflösung von hitzedenaturiertem Kollagen mit Trypsin hinterbleibt ein Rückstand, in dem Hexosen und Hydroxamsäuren etwa in gleichem Maße (z.Bsp. auf das 13 bis 10 fache)^(x) angereichert sind. Das bedeutet, daß es sich bei den hydroxylaminempfindlichen Bindungen um Estergruppierungen handelt, an denen die Hexosen des Kollagens beteiligt sind.

(x) Anmerkung: Das Verhältnis von Hydroxamsäure zu Hexose betrug 2,16.

4.) Die quantitative Bestimmung der Zucker im Kollagen wurde nach der Anthronmethode durchgeführt. Bei der Verfolgung der Anreicherung der Kohlenhydrate des Kollagens im trypsinresistenten Rückstand ergaben sich Anhaltspunkte für das Vorliegen von 2-Desoxyglucose neben den bereits bekannten Zuckern. Außerdem wurde die qualitative Zusammensetzung der Kohlenhydrate des Kollagens und des Kohlenhydratanreicherungsproduktes papierchromatographisch nach Hydrolyse bestimmt. Für die Hydrolyse wurde ein Verfahren entwickelt, wobei die Kationenaustauscherhydrolyse Verwendung fand.

Die experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluß zu, daß die Hexosen Quervernetzungen im Kollagen darstellen und für die Unlöslichkeit von reifem Kollagen verantwortlich sind. Die Hexosen sind mit ihren reduzierenden Gruppen O-glykosidisch, mit einer oder zwei Hydroxylgruppen esterartig an die Eiweißketten gebunden. Im löslichen Kollagen (Prokollagen) sind Quervernetzungen zwischen den einzelnen Kollagen-Monomeren (Tropokollagen) nicht ausgebildet, doch finden sich intramolekulare Vernetzungen zwischen den einzelnen Peptidketten des Makromoleküls.

H. Literaturverzeichnis

- (1) P.A.Zacchariades: C.R.Soc.Biol.Paris 52, 182, 1127 (1900)
- (2) J.Nageotte: C.R.Acad.Sci.Paris 184, 115 (1927)
 J.Nageotte: C.R.Soc.Biol.Paris 96, 172, 464, 828 (1927)
 J.Nageotte: ibidem 97, 559 (1927)
 J.Nageotte: ibidem 98, 15 (1928)
 J.Nageotte: ibidem 104, 156, 186 (1930)
 G.Leplat: ibidem 112, 1256 (1933)
 E.Faure-Fremiet: ibidem 113, 715 (1933)
 J.Nageotte: ibidem 113, 841 (1933)
 J.Nageotte, L.Guyon: C.R.Assoc.Anatom.(Bruxelles) 29, 408 (1934)
- (3) A.A.Tustanowskij: Biochimia 12, 4 (1947)
 A.A.Tustanowskij: ibidem 12, 285 (1947)
 W.N.Orechowitsch, A.A.Tustanowskij, K.D.Orechowitsch: Dokl.Acad.
 Nauk SSSR 57, 5 (1947)
 W.N.Orechowitsch, A.A.Tustanowskij, K.D.Orechowitsch: ibidem
 57, 475 (1947)
 N.Plotnikowa: ibidem 58, 8, 1715 (1947)
 W.N.Orechowitsch, A.A.Tustanowskij, N.Plotnikowa: ibidem
 60, 837 (1948)
 K.D.Orechowitsch: Bjul.eksp.biol.i med.27, 73 (1949)
 W.N.Orechowitsch, A.S.Konikowa, K.D.Orechowitsch, N.N.Dobbert:
 SSSR 71, 105 (1950)
 W.N.Orechowitsch: Communication aux deuxieme Congres Inter-
 national Bioch.Paris 1952, S.106-128
- (4) W.N.Orechowitsch, A.A.Tustanowskij, M.P.Tschernikow: Bjul.exsp.
 biol. i med. 28, 327 (1949)
- (5) W.N.Orechowitsch, A.S.Konikowa, K.D.Orechowitsch, N.N.Dobbert:
 Dokl.Akad.Nauk SSSR 71, 105 (1950)
- (6) F.O.Schmitt, J.Gross, J.H.Highberger: Proc.Natl.Acad.
 Sci.39, 459 (1953)
 J.Gross, J.H.Highberger, F.O.Schmitt: ibidem 41, 1 (1955)
- (7) J.H.Highberger, J.Gross, F.O.Schmitt: J.Am.Chem.Soc.72, 3321 (1950)
 D.S.Jackson, J.H.Fessler: Nature 176, 69 (1955)
- (8) F.O.Schmitt, J.Gross, J.H.Highberger: Proc.Natl.Acad.
 Sci.39, 459 (1953)
- (9) R.O.Harkness, A.M.Marco, H.M.Muir, A.Neuberger: in "Randall"
 Seite 208 (1953)
 R.O.Harkness, A.M.Marco, H.M.Muir, A.Neuberger: Bioch.J.
 56, 558 (1954)
- (10) W.Graßmann: Max Bergmann Memorial Lecture, Vortrag auf der
 4.Zweijahreskonferenz der Intern.Union der Ger-
 bereichemikerverbände in Stockholm. Text siehe
 "Leder" 6, 241 (1955)
- (11) W.Graßmann, H.Schleich: Biochem.Z. 227, 320 (1935)

- (12) J.Beek: J.Res.Nat.Bur.Skand. 27, 507 (1941)
R.Bangle,W.C.Alford: J.Hist.Cytochem. 2, 62 (1954)
J.A.Moss: Biochem.J. 61, 151 (1955)
K.Kühn: Dissertation Darmstadt 1955
- (13) F.Schneider: Vortrag auf der Tagung f.physiol.Chemie in Frankfurt/M. Siehe Angew.Chemie 61, 259 (1949)
- (14) W.Graßmann,H.Hörmann,R.Hafter: Hoppe-S.Ztschft.physiol.Chemie 307, 87 (1957)
- (15) R.F.Goddu,N.F.Le Blank,C.M.W.Wright: Anal.Chem.27,1251(1955)
- (16) W.Graßmann,H.Endres,A.Steber: Z.Naturf.9b, 513 (1954)
W.Graßmann,H.Endres,H.Hörmann: Chem.Ber.86, 1477 (1953)
W.Graßmann,H.Endres,H.Hörmann: ibidem 88, 102 (1955)
- (17) W.Graßmann,K.Kühn: Hoppe-S.Z.physiol.Chem. 301, 1 (1955)
H.Hörmann,G.Fries: ibidem 311, 19 (1958)
- (18) W.N.Orechowitsch,A.A.Tustanowskij,K.D.Orechowitsch,N.Plotnikowa: Biochimia 13, 55 (1948)
J.Gross,J.H.Highberger,F.O.Schmitt: Proc.Nat.Acad. Sci. USA 40, 679 (1954)
D.S.Jackson: Vortrag auf dem Symposium of the British gelatin and glue research Ass.London 1/5.7.1957
W.Graßmann: Leder 6, 241 (1955)
-
Vergleiche dagegen A.A.Tustanowskij,A.L.Saidess,G.W.Orlowskaja,A.A.Michailow: Ber.Acad.Wiss.SSSR 97, 121 (1954)
- (19) W.Graßmann,H.Schleich: Bioch.Z. 27, 320 (1935)
J.Gross,J.H.Highberger,F.O.Schmitt: Proc.Soc.exp.biol.med. 80, 462 (1952)
R.E.Glegg et al.: Science (Washington) 118, 614 (1953)
- (20) I.Keilig: Virch.Arch. 312, 405 (1944)
- (21) Salkowsky, Liebermann-Burchardt: siehe Edlbacner u.F.Leuthardt"Lehrbuch d.Phys.Chem." 1952
- (22) P.A.Gallop,S.Seifter,E.Meilman: Nature 183, 1659 (1959)
- (23) H.Hörmann,M.Klenk: unveröffentlicht
A.Müller: Diplomarbeit München 1958, unveröffentlicht
W.Graßmann,H.Endres: unveröffentlicht
- (24) K.H.Gustavson: Sve.Chem.Tidskr. 67, 116 (1955)
K.H.Gustavson: J.Am.Leath.Chem.Ass. 50, 239 (1955)
- (25) M.G.Sevag: Bioch.Z. 273, 419 (1934)
- (26) K.Kühn: unveröffentlicht, Darmstadt
- (27) H.Hörmann, G.Fries: Hoppe-S.Z.physiol.Chem.311, 19 (1958)
H.Hörmann,K.Hannig,G.Fries: ibidem 315, 109 (1959)
- (28) W.Graßmann: Kolloid Z. 77, 205 (1936)
- (29) H.Hörmann,A.Nordwig,M.Klenk: unveröffentlicht

- (30) H.Hörmann: Beiträge zur Silikoseforschung. Sonderband 2,
Siehe Seite 619 (1957)
- (31) H.Hörmann, A.Nordwig: unveröffentlicht
- (32) W.Graßmann, J.Janicki, F.Schneider: Stiasny-Festschrift 1937,
Darmstadt S.74
- (33) S.G.Tombin, K.J.Turner: Biochim.biophys.Acta 26, 170 (1957)
- (34) K.Wolf: Dissertation München, 1956
- (35) A.Jeanes, C.S.Wise, R.J.Dimler: Anal.Chem. 23, 415 (1951)
- (36) E.W.Yemm, A.J.Willis: Bioch.J. 57, 508 (1954)
- (37) R.Dreywood: Industr.Eng.Chem.(Anal.Ed.) 18, 499 (1946)
- (38) L.H.Köhler: Anal.Chem. 24, 1576 (1952)
L.H.Köhler: ibidem 26, 1914 (1954)
- (39) M.A.Capello: Rev.asoc.biochim.Argentina 18, 41 (1954)
L.C.Mokrasch: J.Biol.Chem. 208, 55 (1954)
- (40) K.Kühn, W.Graßmann, U.Hofmann: Z.Naturforsch., im Druck
- (41) D.S.Jackson: Bioch.J. 699 (1954)
- (42) A.Veis, J.Cohen: J.Am.Chem.Soc. 76, 2476 (1954)
- (43) K.H.Gustavson: Bioch.Z. 311, 347 (1942)
- (44) J.H.Bowes, H.Kenton: Bioch.J. 43, 365 (1948)
J.H.Bowes: Research 4, 155 (1951)
- (45) W.Graßmann, H.Hörmann, H.Endres: Hoppe-S.Z.physiol.Chem.
296, 208 (1954)
W.Graßmann, H.Endres, H.Hörmann: Chem.Ber. 86, 1477 (1953)
W.Graßmann, H.Hörmann, H.Endres: ibidem 88, 102 (1955)
W.Graßmann, H.Hörmann, W.Wünsch, H.Preller: ibidem 89, 933 (1956)
- (46) A.Müller: Diplomarbeit München, unveröffentlicht
- (47) F.Sanger: Bioch.J. 39, 507 (1945)
- (48) U.T.Hill: Ind.Eng.Chem.(Anal.Ed.) 18, 317 (1946)
U.T.Hill: ibidem 19, 932 (1947)
F.C.Bauer, E.F.Hirsch: Arch.Bioch. 20, 242 (1949)
A.R.Thompson: Australian J.Sci.Res. 3A, 128 (1950)
R.E.Buckles, C.J.Thelen: Anal.Chem. 22, 676 (1950)
B.M.Iselin, H.T.Huang, C.Niemann: J.Biol.Chem. 183, 403 (1950)
- (49) I.D.Raacke: Biochim.et biophys.Acta 27, 416 (1958)
- (50) W.Graßmann, W.Heyde: Hoppe-S.Z.physiol.Chem. 183, 32 (1929)
W.Graßmann, W.Heyde: Z.anal.Chem. 80, 94 (1930)
- (51) J.Gross, J.H.Highberger, F.O.Schmitt: Proc.Soc.exp.
Biol.Med. 80, 462 (1952)
- (52) R.F.Glegg, D.Eidinger, C.P.Lebland: Sci.(Lancaster) 120, 839 (1954)
- (53) F.Schneider: Collegium 1940, S.97

- (54) W.Graßmann,E.Zeschitz: Vortrag von W.Graßmann,
Weinheim 1957
- (55) K.Meyer,E.A.Davidson,A.Linker,P.Hoffmann: Biochim.Biophys.
Acta 21, 506 (1956)
- (56) K.Meyer,M.M.Rapport: Science 113, 596 (1951)
- (57) K.H.Wolf, Dissertation München 1956,W.Graßmann,U.Hofmann,
K.Kühn,H.Hörmann,H.Endres,K.Wolf in R.E.Tunbridge,M.Keesch,
J.F.Delafresnaye "Connective Tissue", Oxford 1957,S.157
- (58) K.Kühn,W.Graßmann,U.Hofmann: Z.Naturf. 13b, 154 (1958)
- (59) A.L.Saides,A.A.Tustanowskij,G.W.Orlowskaja: Ber.Akad.Wiss.
SSSR 104, 563 (1955)
- (60) H.Kiliani: Arch.Pharm. 234, 276 (1896)
H.Kiliani: ibidem 251, 567 (1913)
- (61) A.Stoll,W.Kreis: Helv. 16, 1049 (1933)
- (62) J.St.Philpoz: Nature 141, 283 (1938)
H.Svensson: Kolloid Z. 90, 141 (1940)
- (63) H.M.Rauen: Bioch.Taschenbuch S.888 (1956)
- (64) D.F.Boltz,M.G.Mellon: Anal.Chem. 19, 873 (1947)
- (65) R.Borasky,G.C.Nutting JALCA 154, 830 (1949)
- (66) E.Gebhardt: Diplomarbeit München,S.49
- (67) A.J.Hodge,F.O.Schmitt: Proc.Nat.Acad.Sci. 44, 418 (1958)
- (68) J.H.Highberger,J.Gross,F.O.Schmitt: ibidem 37, 86 (1951)
- (69) H.E.Weimer,J.W.Mehl,R.J.Winzler: J.Biol.Chem.185, 561(1950)
K.Schmid: ibidem 75, 60 (1953)
- (70) U.Hofmann,K.Kühn, unveröffentlicht
- (71) F.E.Deatherage,J.C.Paulson: J.Biol.Chem. 205, 909 (1953)
F.E.Deatherage,J.C.Paulson: J.Am.Chem.Soc. 76,6198 (1954)
F.E.Deatherage,J.R.Whitaker: ibidem 77, 3360 (1955)
- (72) P.Doty,T.Nishihara: Proc.Nat.Acad.Sci. 44, 418 (1958)
- (73) Z.Dische: J.Biol.Chem. 167, 189 (1947)
- (74) N.F.Boas: J.Biol.Chem. 204, 553 (1953)
- (75) E.Kofranyi: Naturwiss. 37, 91 (1950)
- (76) R.E.Glegg,D.Eidinger: Anal.Chem. 26, 1365 (1954)
- (77) R.E.Glegg: ibidem 28, 532 (1956)
- (78) F.B.Seibert,J.Atno: J.Biol.Chem. 163, 511 (1946)
- (79) C.Rimington: Bioch.J. 23, 430 (1929)
- (80) C.Neuberg,J.Kerb: Bioch.Z. 40, 494 (1912)
C.Neuberg,J.Kerb: ibidem 67, 119 (1914)
- (81) L.Lison: Histochem.et Cytochem.animaes Paris 1953

- (82) H.M.Rauen: Bioch.Taschenbuch S.847 (1956)
- (83) F.Lipmann,L.C.Tuttle: J.Biol.Chem. 159, 21 (1945)
siehe auch S.P.Colowick,N.O.Kaplan: Methods of Enzymology
III, 231 (1957)
- (84) H.B.Bensusan,B.L.Hoyt: J.Am.Soc. 80, 719 (1958)
- (85) H.Hörmann: Vortrag auf dem VI.Internationalen Lederkongreß
in München 1959, Text siehe "Leder (im Druck)"
- (86) W.J.Williams,J.Litwin,C.B.Thorne: J.Biol.Chem.212,427(1955)
- (87) A.Chatterjee,S.G.Majumdar: Anal.Chem. 28, 878 (1956)
- (88) K.Hannig: unveröffentlicht
- (89) A.Courts,G.Stainsby: Recent Advances in Gelatin and Glue
Research S.100 (1958). Vortrag A.D.Ward am 8.11.59 auf dem
VI.Kongreß der Internationalen Union der Gerbereichemiker=
verbände in München.
- (90) G.V.Reardon,W.N.M.Wiederhorn: Phys.Rev. 78, 359 (1950)
- (91) K.Kühn: Vortrag auf dem VI.Internationalen Lederkongreß in
München 1959, Text siehe Naturw.(im Druck)
- (92) K.Kühn: Naturw. 46, 512 (1959)
K.Kühn: ibidem 47, 15 (1960)
- (93) W.Graßmann: Literaturzusammenstellung siehe Sve.Kem.Tidskr.
72, 275-302 (1960)
- (94) A.Courts: Gelatin and Glue Research S.145 (1958)
- (95) H.Rich,F.H.C.Crick,P.M.Cowan,S.Mc.Gavin,H.C.T.North:
Nature 176, 915 (1955)
- (96) W.Graßmann,K.Wolf: siehe Diskussionsbemerkung W.Graßmann
zum Vortrag von J.Gross in "Connective Tissue" Blackwell
Scientific Publications, Oxford 1957, S.45
- (97) H.Boedtke,P.Doty: J.Am.Chem.Soc. 78, 4267 (1956)
- (98) M.Schleyer: Dissertation München, 1960
- (99) R.Criegee,H.Beuker: Liebig Anal.Chem. 541, 218 (1939)
K.H.Pausacker: J.Chem.Soc.(London) S.107 (1953)
J.F.Lhotka: Nature (London) 174, 882, (1954)

Lebenslauf

Am 28. Januar 1924 wurde ich als Sohn des Maschinenbauingenieurs Hans Klenk und dessen Ehefrau Anna, geborene Pirner, in Nürnberg geboren. Nach Besuch der Volksschulen in Breslau und Nürnberg trat ich 1935 in das Reformrealgymnasium in Schönebeck/Elbe ein. Im Sommer 1942 erhielt ich an der Heinrich-von-Plauen Oberschule in Elbing/Westpr. als Schüler der 8. Klasse infolge meiner Einziehung zum Wehrdienst das Abgangszeugnis mit dem Reifevermerk. Im Verlaufe der Kriegssereignisse geriet ich im Januar 1945 an der Ostfront in russische Kriegsgefangenschaft, aus der ich im Spätsommer 1948 entlassen wurde. Im Wintersemester 1949/50 begann ich mein Chemiestudium an der Philosophisch-Theologischen Hochschule in Regensburg. Im Juni 1955 legte ich an der Universität in München mein Diplomchemiker-Hauptexamen ab. Anschließend führte ich meine Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung in Regensburg durch. Nach einjähriger Berufsausübung in den "Deutschen Gelatine Fabriken" in Göppingen/Württ. begann ich im Juli 1958 meine Dr. Arbeit, die unter der Leitung von Herrn Professor Dr. W. Graßmann am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung in München durchgeführt und im Juli 1960 beendet wurde.

